

# 有毒藻類が生産する食中毒原因毒の微量分析ならびに構造解析に関する研究

著者	内田 肇
学位名	博士(海洋科学)
学位授与機関	東京海洋大学
学位授与年度	2014
学位授与番号	12614博甲第357号
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1342/00001076/">http://id.nii.ac.jp/1342/00001076/</a>

博士学位論文

有毒藻類が生産する食中毒原因毒の  
微量分析ならびに構造解析に関する研究

平成 26 年度

(2015 年 3 月)

東京海洋大学大学院

海洋科学技術研究科

応用環境システム学専攻

内田 肇



博士学位論文

有毒藻類が生産する食中毒原因毒の  
微量分析ならびに構造解析に関する研究

平成 26 年度

(2015 年 3 月)

東京海洋大学大学院

海洋科学技術研究科

応用環境システム学専攻

内田 肇



有毒藻類が生産する食中毒原因毒の  
微量分析ならびに構造解析に関する研究  
内田 肇

目次	1
序論	4
二枚貝の食中毒	
魚介類の食中毒	
下痢性貝毒の分析法	
日本沿岸域における有毒微細藻類	
本研究の概要	
図表	19
 第 1 章	
下痢性・脂溶性貝毒の LC/MS 分析におけるマトリックス効果に関する研究	29
試料および方法	29
試料	
試薬	
下痢性・脂溶性貝毒標準品	
検量線	
二枚貝抽出液の調製	
下痢性・脂溶性貝毒添加試料の調製	
LC/MS 分析	
カートリッジカラムによるマトリックス効果原因物質の除去	
固相抽出前処理法の添加回収実験	
結果および考察	32
下痢性・脂溶性貝毒の SIM 分析	
LC/MS 分析における二枚貝マトリックスの影響	
カートリッジカラムによるマトリックス効果原因物質の除去効率	
添加回収実験によるカートリッジカラム前処理法の検証	
図表	36

## 第 2 章

下痢性貝毒オカダ酸群の自動前処理蛍光 HPLC 分析法の確立	44
試料および方法	44
試薬	
試料	
0.2% ADAM/メタノール溶液の調製	
下痢性貝毒標準品	
OA 群蛍光誘導体の標準品調製	
二枚貝試料の抽出および蛍光誘導体の調製	
カラムスイッチングによる自動前処理蛍光 HPLC 分析	
前処理カラムによる AM-OA・AM-DTX1 の蛍光 HPLC 分析	
添加試料の調製	
LC/MS および LC/MS/MS 分析	
結果および考察	48
OA 群 ADAM 誘導体のカラムスイッチング条件	
添加回収実験	
LC/MS 分析との相関	
MS/MS スペクトルによる OA 群 ADAM 誘導体の同定	
図表	51

## 第 3 章

国内沿岸で採取した珪藻 <i>Pseudo-nitzschia</i> 属の LC/MS/MS 分析による 記憶喪失性貝毒ドウモイ酸生産能の解析	66
試料および方法	66
試薬	
DA 標準品	
トリプル四重極 LC/MS/MS 分析	
QTOFMS 分析	
<i>Pseudo-nitzschia</i> 属の培養および同定	
LC/MS/MS 分析試料調製	
固相抽出カラムによる DA の濃縮	
結果および考察	69

添加回収実験	
<i>Pseudo-nitzschia</i> 属の DA 生産能	
DA の MS/MS フラグメントイオンの帰属	
図表	72
第 4 章	
LC/MS/MS 分析による有毒渦鞭毛藻類 <i>Ostreopsis ovata</i> が 生産するパリトキシン類縁体の探索・構造解析	79
試料および方法	79
試薬	
PLTX 標準品	
試料および抽出	
トリプル四重極 LC/MS/MS 分析	
LC/QTOFMS 分析	
結果および考察	82
MRM 分析による OVTX 群の分析	
LC/QTOFMS による OVTX 群分析	
新規 PLTX 類縁体の検索	
OVTX-aAC の MS/MS による構造解析	
図表	86
総括	110
参考文献	112
謝辞	132

## 序論

海洋生物毒を原因とする食中毒の多くは、食物連鎖を介して毒を蓄積した魚介類の喫食により発生する。これらの食中毒の原因となる毒の殆どは有毒微細藻類が生産する海洋生物毒である。毒力が極めて強いため、微量の毒で中毒が発生することが海洋生物毒による食中毒の特徴である。食品衛生上の重要性から、魚介類中に含まれる原因毒の化学構造の解析ならびに定量法の開発、代謝毒の検索や原因藻類が生産する新規類縁体の検索など様々な研究が行われてきた。

これらの海洋生物毒による食中毒の防止および原因毒を同定するために、マウス腹腔内に魚介類の毒抽出液を投与し、マウスの生死や死亡時間により毒力を判定するマウス毒性試験が行われている。わが国では二枚貝の毒化の原因となる下痢性・脂溶性貝毒、麻痺性貝毒の監視において、マウス毒性試験を公定法とした検査体制が確立されており、これらの貝毒による食中毒を未然に防止している。しかしながら、下痢性・脂溶性貝毒において、マウス毒性試験は検出している毒の種類に関して得られる情報は極めて少なく、特異性も低い。また、偽陽性反応も見られることから、マウス毒性試験に替わる検査法の開発が行われている。さらに、欧米諸国ではマウス毒性試験のように動物を用いた検査を制限し、機器分析などの非動物検査法への移行を推進している。わが国においても下痢性貝毒検査について、段階的にマウス毒性試験から **LC/MS/MS** 法などの機器分析による検査へ移行する見通しとなっている。また、機器分析による海洋生物毒の検査は、食品衛生および漁業者への経済的被害の観点から、高感度かつ信頼性の高い定量分析法が求められる。

さらに、わが国では発生例のない食中毒においても、原因毒を生産する有毒微細藻類の発生が確認されており、魚介類の毒化のリスクが存在する。これらの有毒微細藻類の本邦沿岸域における毒生産能や毒組成を明らかにし、監視体制を整える必要がある。原因毒の新規類縁体を含めた毒生産能および毒組成の解明には **LC/MS/MS** 分析による構造情報を含めた網羅的な解析が非常に有用である。

本序論において、有毒微細藻類が生産する毒による食中毒および下痢性・脂溶性貝毒を中心に分析法について概説する。

## 二枚貝の食中毒

イガイ、カキ、ホタテガイなど二枚貝は、大量の海水をろ過し、主に微細藻類を摂食する。摂食した微細藻類に有毒微細藻類が含まれていると、有毒微細藻類が生産した毒を蓄積して二枚貝が毒化する(D. M. Anderson *et al.* 2001)。こうして毒化した二枚貝をヒトが喫食することにより、二枚貝中毒が発生する。これまでに明らかとなっている主な二枚貝による食中毒と原因藻類について(Table.1)に示す。わが国の二枚貝においては、下痢性・脂溶性貝毒および麻痺性貝毒による毒化と中毒事例が知られている。

下痢性貝中毒(Diarrhetic shellfish poisoning : DSP)は 1976 年に宮城県でムラサキイガイによる食中毒が発生したことを発端に発見された中毒である(Yasumoto *et al.* 1978)。日本、ヨーロッパ、北米等、世界各国で下痢性貝毒による中毒事例が報告されている(Masanori Kumagai *et al.* 1986, Paulo Vale *et al.* 2002, V. Hossen *et al.* 2011, Marsha Taylor *et al.* 2013, Jennifer K. Lloyd 2013)。本中毒の主症状は、約 3 時間以内に下痢・吐き気・腹痛・嘔吐などの症状を呈するが、発熱がないことが特徴である(Yasumoto *et al.* 1978)。また、下痢性貝毒による死亡例は報告されていない。下痢性貝毒は多数のエーテル結合を有する脂溶性のポリエーテル化合物であり、化学構造の違いから 3 群に分類されてきた。

第 1 群はオカダ酸(okadaic acid : OA)群、ジノフィシストキシン(dinophysistoxin : DTX)群で、有毒渦鞭毛藻類の *Dinophysis* 属や *Prorocentrum lima* が生産する(Takeshi Yasumoto *et al.* 1980, 1982, Michio Murata *et al.* 1982)。OA はクロイソカイメンから単離・構造決定された化合物であり(Kazuo Tachibana *et al.* 1981)、生産する有毒渦鞭毛藻類からカルボキシ基に対し、ジオールがエステル結合した OA ジオールエステル群など多くの類縁体(Fig.1)が報告されている(Takeshi Yasumoto *et al.* 1987, Gordon R. Macoherson *et al.* 2003, Toshiyuki Suzuki *et al.* 2004, Elie Fux *et al.* 2011)。また、二枚貝中では OA, DTX1 の C7 位のヒドロキシ基と脂肪酸がエステル結合した 7-*O*-acyl-OA や -DTX1 に代謝され、これらは DTX3 と総称されている(Takeshi Yasumoto *et al.* 1985)。DTX3 はマウス

腹腔内投与における最小致死量が OA, DTX1 の 160  $\mu\text{g/kg b.w.}$  (body weight) に対し、500  $\mu\text{g/kg b.w.}$  と毒力が低い (Michio Murata *et al.* 1982, Masamichi Ishige *et al.* 1988, Takeshi Yasumoto *et al.* 1989)。また、OA 群はマウスおよびラットに対し、腹腔内または経口投与による急性毒性試験において下痢原性が確認されている。OA および DTX1 に特徴的な生理活性としてプロテインホスファターゼ 1, 2A (PP1, PP2A) に結合し強く阻害する (Corinna Bialojan *et al.* 1988)。このことから、PP2A に対する阻害活性により、タンパク質の脱リン酸化が阻害され、リン酸化タンパク質が蓄積することが下痢原性の一因と推察されている (Shinji Nishiwaki *et al.* 1990)。また、T84 細胞および Caco2 細胞の単層培養細胞シートを用いた実験では、OA 濃度が 600 nM および 500 nM の濃度で経上皮電気抵抗が減少したが、細胞障害は見られなかった (Jyoti Tripuraneni *et al.* 1997, Anke Ehlers *et al.* 2011)。これらの実験より、腸管において傍細胞経路の透過性が増加することによって下痢原性を示すと考えられる。齧歯類を用いた皮膚二段階発ガン試験および腺胃二段階発ガン試験において、OA および DTX1 は発ガン促進作用を持つと報告されているが (Hirota Fujiki *et al.* 1988, Masami Suganuma 1992)、長期間の投与による発ガン性試験等の報告はない。

第 2 群はペクテノトキシン (pectenotoxin : PTX) 群で、OA, DTX 群と同様に有毒渦鞭毛藻類の *Dinophysis* 属が生産する (Jong Soo Lee *et al.* 1989, Toshiyuki Suzuki *et al.* 1998)。ホタテガイから発見され (Takeshi Yasumoto *et al.* 1985)、ラクトン環を持つ環状のポリエーテル化合物であり、*Dinophysis* 属が生産する類縁体 (Toshiyuki Suzuki *et al.* 2006, Christopher Owen Milesa 2006) や二枚貝の代謝物が多く報告されている (Fig.2)。日本のホタテガイは *Dinophysis* 属が生産した PTX2 の 18 位にあるメチル基を特異的に PTX1, PTX3, PTX6 へと段階的に酸化し (Michio Murata *et al.* 1986, Takeshi Yasumoto *et al.* 1993)、イガイ類およびニュージーランドホタテガイ等の二枚貝の多くは無毒成分である PTX2 セコ酸へ代謝する (Toshiyuki Suzuki *et al.* Toxicon, 2001)。PTX2 はアクチンの重合を抑制し (Masatoshi Hori *et al.* 1999, Suzanne C. Butler *et al.* 2012)、マウス腹腔内投与では強い肝臓毒性が報告されている (Kiyoshi Teruo *et al.* 1986)。しかし、経口投与において顕著な下

痢原生は報告されていない(Christopher Owen Miles *et al.* 2004, Emiko Ito *et al.* 2008)。また、PTX 群を原因とするヒトに対する健康被害はこれまで報告されていない。

第 3 群はイエッソトキシン (yessotoxin : YTX)群で、ホタテガイから単離され、エーテル環 11 個が梯子状に連結した特徴的な構造を有するポリエーテル化合物であり(Michio Murata *et al.* 1987) (Fig.3)、有毒渦鞭毛藻の *Protoceratium reticulatum* などによって生産される(Masayuki Satake *et al.* 1997)。35 成分以上の類縁体が報告されており(Christopher O. Miles *et al.* 2005, Beatriz Paz *et al.* 2008)、これまでに日本、ヨーロッパ、北米、オセアニア等で様々な二枚貝から YTX 群が検出されている(FAO Fisheries and Aquaculture technical paper. 2011)。マウス腹腔内投与による YTX の LD<sub>50</sub> は約 100~750 µg/kg b.w.であるのに対し、経口投与においては 1 mg/kg 投与しても致死および毒性、下痢原性は確認されなかった(Hiroyuki Ogino *et al.* 1997, T. Aune *et al.* 2002)。YTX を 1 mg/kg b.w.腹腔内投与および 10 mg/kg b.w. 経口投与した際に電子顕微鏡検査において、心筋細胞の膨張が報告されている(A. Tubaro *et al.* 2003)。YTX 群も PTX 群と同様にヒトへの健康被害は確認されていない。

これらのことから現在は PTX 群および YTX 群は脂溶性貝毒(Lipophilic shellfish toxin)と分類され、下痢性貝毒とは区別されている。さらに PTX 群や YTX 群はヒトに対する中毒事例が確認されていないため、Codex によって検討されている海洋生物毒の基準値において、規制の対象から外れており、米国や韓国は規制対象外としている。

麻痺性貝中毒 (Paralytic shellfish poisoning:PSP) はアジア、ヨーロッパ、北中南米、アフリカ、オセアニアなど世界中で発生しており(European Food Safety Authority 2009)、わが国ではマガキ、アサリ、ムラサキイガイ、ホタテガイなどの二枚貝のほかマボヤやウモレオウギガニなどが中毒の原因食品となっている(Yuji Nagashima *et al.* 1984, Kanehisa Hashimoto *et al.* 1986)。原因毒であるサキシトキシン(Saxitoxin : STX)群は、二つのグアニジウム基と一つの飽水型ケトンを持つ塩基性の神経毒であり、40 成分以上の類縁体が報告されているが、主要毒は 18 種類である(Fig.4)(Edward J. schantz *et al.* 1957, 1974)。STX 群は有毒渦鞭毛

藻の *Alexandrium* 属、*Gymnodinium* 属や淡水産ラン藻の *Anabaena* 属、*Lyngbya* 属などによって生産される (Maria Wiese *et al.* 2010)。STX 群はフグ毒のテトロドトキシンと同様にナトリウムチャンネルに結合し、細胞外からのナトリウムイオンの流入を阻害する (R. Henderson *et al.* 1974, William A. Catterall *et al.* 2007)。マウスに対する LD<sub>50</sub> は経口投与において 260~263 µg/kg b.w. 腹腔内投与においては 9.0~11.6 µg/kg b.w. と報告されている (M. N. Mons *et al.* 1998)。中毒症状は食後 30 分ほどで口唇や手足の麻痺症状が始まり、重篤な場合には、呼吸困難となり死に至る。

記憶喪失性貝中毒 (Amnesic shellfish poisoning : ASP) の原因毒であるドモイ酸 (domoic acid : DA) は回虫の駆虫成分として紅藻類のフジマツモ科ハナヤナギから単離・構造決定されたアミノ酸化合物である (Tunematsu Takemoto *et al.* 1966)。DA は、中枢神経伝達物質の L-グルタミン酸と同様の分子構造を持つ (Fig.5) ため、DA 群やカイニン酸はアゴニストとして作用する。L-グルタミン酸と比較し海馬にあるグルタミン酸受容体に強く結合するため、脳細胞が異常興奮・壊死する (Olga M. Pulido *et al.* 2008)。マウスに対する LD<sub>50</sub> 値は腹腔内投与で 3.6 mg/kg b.w. と他の海洋生物毒よりも低い (Bryan Grimmelt *et al.* 1990)。中毒症状として、食後 3~6 時間以内に腹痛や下痢、嘔吐の初期症状が見られ、意識の混濁、見当識の喪失、記憶喪失が見られる (Ewen C. D. Todd *et al.* 1993)。記憶喪失性貝中毒は、1987 年にカナダのプリンスエドワード島でムラサキイガイを原因とするヒトの中毒事例が報告されているが、公式な記録として本事例の他に報告例はない。プリンスエドワード島での中毒事例では、中毒患者数は 100 名以上報告され、そのうち 3 名が死亡した (J. L. C. Wright *et al.* 1989)。中毒検体として残されていたムラサキイガイの DA 含有量は 31 から 128 mg/100 g に達していたことが報告されている (Trish M. Perl *et al.* 1990)。ヒトに対する経口毒性は 60~110 mg で発症し、135~295 mg で重症化するとされる (Ewen C. D. Todd *et al.* 1993.)。日本国内において記憶喪失性貝毒に対する監視体制や規制値は定められておらず、輸出時に行われる貝毒検査では、米国やカナダの規制値である 20 ppm を基準値とする検査が行われているが、二枚貝から毒が検出された事例は報告されていない (Kathi A. Lefebvre *et al.* 2010)。記憶喪失性貝毒の検査方法は、マウス毒



性試験において DA のマウス腹腔内投与による毒性が低いことから適していない。そのため、LC-UV 法や LC/MS/MS 法により検出・定量されている (Michael A. Quilliam *et al.* 1995, A. Furey *et al.* 2001)。記憶喪失性貝毒は珪藻の *Pseudo-nitzschia* 属や *Nitzschia* 属、*Amphora* 属によって生産され (S. S. Bates *et al.* 1989, Yuichi Kotaki *et al.* 2000, Yuzuru Shimizu *et al.* 1989)、*P. multiseries* の DA 生産能が高いとされている (Yuichi Kotaki 2008)。本邦において大船渡湾で採集された *P. multiseries* から DA の生産が確認されている (Yuichi Kotaki *et al.* 1999)。わが国において様々な種の *Pseudo-nitzschia* 属の生息が確認されているが (Aurelie Lelong *et al.* 2012)、国内沿岸域における種間の毒生産能についての知見はほとんどない。

神経性貝毒中毒 (Neurotoxic shellfish poisoning : NSP) は 1992 年にニュージーランドで二枚貝による 280 名以上の食中毒が発生 (Bates *et al.* 1993) し、中毒検体からブレベトキシン (brevetoxin : BTX) 類縁体が発見された (Hitoshi Ishida *et al.* 1995, Kazuya Murata *et al.* 1998)。BTX 群は有毒渦鞭毛藻の *Karenia brevis* から、魚類の大量斃死を引き起こす魚毒成分として発見された化合物で、基本骨格構造の違いにより BTX A 型と BTX B 型に分けられる (Fig.6) (Yong-Yeng Lin *et al.* 1981, Yuzuru Shimizu *et al.* 1986)。中毒症状として手足や顔面の痺れ、かゆみ、知覚異常、温度感覚の逆転 (ドライアイスセンセーション) や倦怠感、頭痛、筋肉痛などの神経症状を呈し、通常では 1 日～2 日程度で回復する。これらの神経症状は BTX 群がナトリウムチャンネルに特異的に結合し、サキシトキシン群とは逆に細胞内へナトリウムイオンの流入を活性化させることにより発現すると推察されている (Alain Lombet *et al.* 1987)。

アザスピロ酸 (azaspiracid: AZA) 群を原因とする食中毒は、1995 年にオランダでアイルランド産のムラサキイガイによる食中毒が最初の例であり、アイルランド、イタリア、フランス、イギリス、米国等でアイルランド産のムラサキイガイを原因とする食中毒が報告されている (Michael J. Twiner *et al.* 2014)。AZA 群はアザスピロ環を持つポリエーテル化合物であり (Masayuki Satake *et al.* 1998, Katsuya Ofuji *et al.* 1998, Emiko Ito *et al.* 2000) (Fig.7)、中毒症状は下痢・吐き気・腹痛・嘔吐と下痢性貝毒と類似してい

るが、PP1、PP2A に対する阻害作用はなく、リンパ球の壊死や(A.F. Flanagan *et al.* 2001, Michael J. Twiner *et al.* 2005)、マウスに対して肝臓の脂肪化や肺の浮腫などが見られる(Emiko Ito *et al.* 2002, Michael J. Twiner *et al.* 2008)。原因藻として *Azadinium spinosum* など新種の小型渦鞭毛藻類が AZA 群を生産することが確認されている(Urban Tillmann *et al.* 2009)。

このように海洋生物毒による二枚貝の食中毒は、中毒症状により分類され、下痢性貝毒・麻痺性貝毒は世界各国で発生しており、発生海域は拡大傾向にある。わが国の二枚貝において記憶喪失性貝毒、神経性貝毒、アザスピロ酸による毒化・中毒事例は確認されていないことから、国内で消費される国産二枚貝については、これらの貝毒に対する監視体制は整備されていない。

### 魚介類の食中毒

有毒渦鞭毛藻類が生産した毒を原因とする魚介類の食中毒にシガテラ中毒やパリトキシシン中毒があり、いずれも有毒渦鞭毛藻類が生産した毒を食物連鎖によって魚介類が蓄積し、毒化すると考えられている。

シガテラ中毒(Ciguatera fish poisoning:CFP)は熱帯・亜熱帯のサンゴ礁を中心に年間 2 万人以上の発生が推定されており(Leigh Lehane *et al.* 2000, J.C. de Fouw *et al.* 2001)、世界最大規模の自然毒による食中毒とされている。わが国では、シガテラ中毒の多くが沖縄県で発生しており、主にフエダイ科のバラフエダイ・イッテンフエダイ、ハタ科のバラハタなど肉食魚類が中毒の原因魚となっている。また、これらの肉食魚は大きい個体になると有毒率が高まることが報告されている(Naomasa Oshiro *et al.* 2010)。シガテラ中毒の原因毒はシガトキシシン(ciguatoxin : CTX)群で、エーテル環が梯子状に連なったポリエーテル化合物であり、基本骨格構造の違いから CTX1B, 3C 型(Michio Murata *et al.* 1989, Masayuki Satake *et al.* 1993)、カリブ海型の C-CTX 型(Fig.8)、化学構造が明らかになっていないインド洋型の I-CTX 型が報告されている(Richard J. Lewis *et al.* 1998)。CTX 生産藻類として *Gambierdiscus toxicus* が CTX3C および CTX4A, 4B を生産することが報告されている(Michio Murata *et al.* 1990, Masayuki Satake *et al.* 1997)。これらの成分が食物連鎖の過程で酸化され、毒性の強い CTX1B や

51-hydroxy CTX3C などに変換し(Masayuki Satake *et al.* 1998)、シガテラ中毒の原因毒となると推定されているが、中毒の詳細については不明な点が多い。CTX 群は毒性が非常に強く、最も毒性の強い成分 CTX1B はマウス腹腔内投与による致死活性は 350 ng/kg b.w.とされ、ヒトの最小発症量は経口摂取で 70 ng と推定されている(Takeshi Yasumoto. 2005)。CTX 群は BTX 群と同様にナトリウムチャンネルに結合しナトリウムイオンの流入を活性化させる作用を示す(Jean-Nod Bidard *et al.* 1984)。症状において BTX 群と類似した消化器系の症状、神経系症状の症状を呈するが、症状が半年以上と長期化する事例も報告されている。

パリトキシン(Palytoxin:PLTX)はイワスナギンチャクの *palythoa toxica* から単離構造解析された平均分子量が 2681 の巨大な化合物であり、糖類やペプチド、核酸とは異なり繰り返し構造を持たず、多数のヒドロキシ基を有するポリオール化合物である(Richard E. Moore *et al.* 1971, 1981)。PLTX 類縁体であるオストレオシン(OST)群やオバトキシン(OVTX)群は、有毒渦鞭毛藻類の *Ostreopsis* 属により生産されることが知られている(Masaya Usami *et al.* 1995, Takanori Ukena *et al.* 2001, Patrizia Ciminiello *et al.* 2012)(Fig.9)。

熱帯や亜熱帯に生息するニシン類やイワシ類の喫食によって、クルペオトキシズムと呼ばれる致死率が高い食中毒が発生する(Yutaka Onuma *et al.* 1999)。この食中毒は、喫食した際に、異常な金属味を感じ、吐き気、嘔吐、下痢、腹痛、筋肉痛、倦怠感などの症状に加え、悪寒、血圧の低下、頻脈など虚脱症状を伴い、重症の場合 15 分ほどで死亡する。またフィリピンなどの南方海域ではクルペオトキシズムと類似した症状の食中毒がヒロハオウギガニなどオウギガニ科のカニによって発生している(Angel. C. Alcala *et al.* 1988)。マダガスカルで発生したイワシ類による食中毒は、中毒検体の頭部からクロマトグラフィーの挙動が PLTX と一致し、PLTX 抗体で阻害される遅延性溶血活性が発見された。さらに MALDI-TOFMS の結果から PLTX 類縁体と推定され、本中毒の原因毒であることが推測されている(Yutaka Onuma *et al.* 1999)。また、フィリピンに生息するオウギガニの 2 種のカニから高い濃度の PLTX 群が検出され、各種クロマトグラフィーの挙動や精製した毒のマウス対する投与量と致死時間が一致するこ

とから、中毒原因が PLTX 類縁体であることが推定された (Takeshi Yasumoto *et al.* 1986)。

わが国では、アオブダイやハコフグなどを喫食した際に発生する食中毒が発生しており、中毒検体がウツバインや PLTX 抗体によって抑制される遅延性溶血活性やマウス致死活性を持つ (Shigeto Taniyama. 2008) ことから原因毒が PLTX および PLTX 関連物質と考えられ、PLTX 様食中毒と呼ばれている。しかし、中毒検体から既知毒の PLTX および PLTX 類縁体は LC/MS/MS 分析により検出されなかった (Toshiyuki Suzuki *et al.* 2013)。さらに、マウス致死活性の低さや、投与量と致死時間が PLTX と大きく異なることから原因物質は PLTX 関連物質とは異なる化合物の可能性も指摘されている (Takeshi Yasumoto. 2013)。

これらの有毒微細藻類が生産する毒による二枚貝や魚類の食中毒に対し、マウスに対して感受性の低い DA を除き、マウス毒性試験が広く採用されている。これらの海洋生物毒が特異性、感度、精度の高い機器分析法に移行することで、食の安全性は向上し、下痢性貝毒においては過剰な規制の減少も期待される。機器分析へ移行するためには有毒微細藻類が生産する毒組成や新規類縁体の解析および魚介類中に含まれる毒代謝物の網羅的解析や毒の高感度な定量法開発が重要な課題である。

#### 下痢性貝毒の分析法

わが国における下痢性貝毒検査の公定法は、マウス腹腔内投与によるマウス毒性試験である。体重 16~20 g のマウスを 24 時間で死亡する毒力を 1 マウスユニット (MU) として定義し、食品 1 g あたりの基準値を 0.05 MU 以下と定めている (環乳第 37 号, 1981)。0.05 MU を DTX1 に換算すると約 0.16  $\mu\text{g/g}$  となる。一方、マウス毒性試験では下痢性貝毒 OA, DTX 群の他に、PTX 群や YTX 群も検出する。さらに、遊離不飽和脂肪酸もマウス毒性試験によって検出されることも報告されている (Toru Takagi *et al.* 1984)。このようにマウス毒性試験は特異性に欠け、下痢性貝毒 OA, DTX 群の検査法としては、妥当ではないことが近年指摘されてきた。

マウス毒性試験に替わる下痢性貝毒の検査法として、液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) 法または液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (LC/MS/MS) 法が確立されている。定量分

析においては操作が容易な四重極型(QMS)の質量分析計が用いられることが多い。この手法は下痢性貝毒の OA, DTX 群と脂溶性貝毒の PTX 群、YTX 群を一斉分析することが可能である (Michael A. Quilliam *et al.* 2011)。さらに LC/MS 法の定量結果はマウス毒性試験の結果と高い相関性が確認されている (Toshiyuki Suzuki *et al.* 2005)。イオン化法は一般的にエレクトロスプレーイオン化法 (electrospray ionization : ESI) が用いられる。LC/MS 法では対象化合物のイオンを選択的に検出する選択イオンモニタリング (Selective ion monitoring : SIM) 法で行われる。LC/MS/MS 法ではプリカーサーイオンを第一四重極(Q1)で選択し、コリジョンセル(Q2)で、窒素やアルゴンなど不活性ガスとの衝突によって分子を開裂させ、生成したプロダクトイオンを第三四重極(Q3)より選択する多重反応モニタリング (Multiple reaction monitoring : MRM) によって、より選択性の高い検出が可能となっている (Toshiyuki Suzuki *et al.* 2011)。さらに LC/MS/MS 法は化合物の構造解析においても非常に有用な手法であり、MS/MS 分析で得られる特徴的なプロダクトイオンを既知の化学構造へ体系的に帰属することにより、フラグメントパターンから新規類縁体の化学構造を推定することが可能である (Toshiyuki Suzuki *et al.* 2006)。また極めて高感度な分析法であるため、微量な試料においても構造解析に有益な情報が得られる。

高感度分析が可能である反面、LC/MS, MS/MS 法による定量分析においては、生体試料中の夾雑物(マトリックス)の影響により目的化合物のイオン化が抑制もしくは促進するマトリックス効果によって、測定値が真値から外れることが多くの化合物で報告されている。下痢性・脂溶性貝毒の LC/MS 分析においてもマトリックスの影響が報告されている (Shinya ito *et al.* 2001)。欧州連合(EU)の下痢性・脂溶性貝毒分析における標準作業手順書(SOP)では既知量の毒を含む試料の回収率から測定値の補正を行う手法を用いている (European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins. 2011)。しかし、全ての試料において同一のマトリックス効果を受けるとは限らないため、マトリックスに依存しない分析法や前処理法の確立が求められている。

また、質量分析法の他に OA, DTX 群の定量法として OA, DTX 群のカルボキシル基に対し蛍光化試薬 9-anthryldiazomethane を反

応させた蛍光 HPLC 法が確立されている (Jong Soo Lee *et al.* 1987)。しかし、試料調製時の前処理が煩雑であることに加え、回収率・再現性についても十分な検討が行われていない。さらに、簡易的な検出法としては、OA 群が有する PP2A 酵素阻害活性を利用し、p-Nitrophenylphosphate を基質とした PP2A による加水分解率により OA 群を定量する測定法 (Minoru Isobe *et al.* 1995) が確立されている。

#### 日本沿岸域における有毒微細藻類

わが国の二枚貝は下痢性・脂溶性貝毒、麻痺性貝毒により毒化し、二枚貝の出荷が規制される。下痢性貝毒は *Dinophysis* 属や *Prorocentrum* 属が OA, DTX 群を生産し、日本沿岸域において、主に北海毒や東北地方で発生する。主な原因藻は有毒渦鞭毛藻の *Dinophysis acuminata*, *D. fortii* の 2 種とされる (Takeshi Yasumoto *et al.* 1980, Toshiyuki Suzuki *et al.* 2009)。一方、西日本海域においても同様に *Dinophysis* 属の発生が報告されているが、下痢性貝毒による毒化事例は少なく、散発的な毒化が報告されている (Naotsugu Hatanaka *et al.* 2011)。*Dinophysis* 属は同種においても海域の違いから、生産する毒の組成が異なることが報告されており (J. S. Lee *et al.* 1989)、原因藻の発生と二枚貝の毒化について不明な点も多く存在する。麻痺性貝毒は有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium* 属, *Gymnodinium catenatum* による生産が報告されている。*A. tamarense* および *A. catenella* は日本沿岸に広く分布することが確認されている。また、瀬戸内海では *A. tamiyavanichii*、山口県および大分県では *Gymnodinium catenatum* の分布が報告されている (Kazumi Matsuoka *et al.* 2006, 今井一郎 *et al.* 2007)。本邦沿岸域において、これらの 4 種を原因藻とする二枚貝の毒化が報告されている。

また、本邦の南方海域で発生するシガテラ中毒の原因毒である CTX 群は底生有毒渦鞭毛藻 *Gambierdiscus* 属が生産することで知られており (Mireille Chinain *et al.* 2010)、西日本沿岸域においても *Gambierdiscus* 属の分布が確認されている (Ryoma Kamikawa *et al.* 2010)。しかし、本邦の *Gambierdiscus* 属から CTX 群の検出は報告されていない。

わが国では中毒事例のない記憶喪失性貝毒を生産する珪藻

*Pseudo-nitzschia* 属や神経性貝毒を生産する渦鞭毛藻 *Karenia brevis*、PLTX 類縁体を生産する底生渦鞭毛藻 *Ostreopsis* 属の分布が報告されている。また本邦の *Pseudo-nitzschia* 属や *Ostreopsis* 属からは DA や PLTX 類縁体の生産が報告されている (Yuichi Kotaki *et al.* 1999, Takanori Ukena *et al.* 2001, Hideki Uchida *et al.* 2013)。また、*Pseudo-nitzschia* 属は同種においても海域によって DA 生産能の有無が分かれており (Aurelie Lelong *et al.* 2012)、日本沿岸域の *Pseudo-nitzschia* 属出現種および DA 生産能の解析が重要である。PLTX 関連化合物はアオブダイやハコフグによる食中毒の原因と疑われており、PLTX 群の LC/MS/MS 分析による検出には、日本沿岸域の *Ostreopsis* 属が生産する PLTX 類縁体の網羅的な解析が必要である。

日本沿岸域において、環境の変動に伴い毒化例のない原因藻が増殖し、魚介類が毒化することが懸念される。下痢性貝毒や麻痺性貝毒を生産する原因藻に加え、日本沿岸域に分布する様々な有毒微細藻類についてもモニタリング体制や原因毒の分析体制を整備する必要がある。

## 本研究の概要

本研究では、わが国の二枚貝において発生する下痢性・脂溶性貝毒の LC/MS 分析や蛍光 HPLC 分析の機器分析法について、高感度かつ精密な定量法を検討した。さらに、LC/MS/MS 分析により、わが国で発生例のない記憶喪失性貝毒や PLTX を生産する原因微細藻の毒生産能および新規類縁体の探索・構造解析を行った。本研究は、機器分析により原因毒の信頼性の高い定量分析法の開発や有毒微細藻類のモニタリングに有益な知見を得ることによって、機器分析による食の安心・安全の向上に資することを目的としている。

第 1 章では、わが国で開発された下痢性・脂溶性貝毒の LC/MS 分析法における二枚貝マトリックスの影響を、下痢性・脂溶性貝毒で主に毒化するムラサキイガイおよびホタテガイを用いて評価した。LC/MS 分析の陰イオンモードにおいて二枚貝試料中の下痢性・脂溶性貝毒は、マトリックス効果によりイオン化が促進した。さらに、カートリッジカラムを用いた前処理によるイオン化促進物質の効率的な除去法を検討した。下痢性・脂溶性貝毒の LC/MS

分析において Captiva ND<sup>Lipid</sup>, Oasis MCX plus の 2 種のカートリッジカラムによる前処理が有効であることが明らかになった。

第 2 章では下痢性貝毒 OA 群の蛍光 HPLC 分析にカラムスイッチングシステムを導入し、回収率や再現性の低下の要因となるシリカカラムによる煩雑な前処理操作を省略した自動前処理蛍光 HPLC 分析法を確立した。前処理カラムとして疎水性相互作用の低いシアノプロピル基(CN)を有するカラムにより、OA 群蛍光誘導体と夾雑物を分離した。前処理カラムより OA 群蛍光誘導体が溶出する画分をカラムスイッチングにより、トリアコンチル基(C30)を有する濃縮カラムへ導入した。濃縮カラムへ分取した OA 群蛍光誘導体の画分は分析用の C30 カラムによって、完全に夾雑物と分離し検出した。

本法は添加回収実験により 0.08, 0.16, 0.8 µg/g の濃度において非常に精確な定量が可能であり、検出感度も LC/MS 法と同等であった。天然で毒化したムラサキイガイ試料について本法と LC/MS 法による定量値は高い相関が得られ、LC/MS 法と同等以上の高感度かつ精確な手法であることが確認された。

第 3 章では国内で発生例のない記憶喪失性貝毒を生産する珪藻 *Pseudo-nitzschia* 属について、LC/MS/MS 分析により本邦の出現種培養株の DA 生産能を調べた。さらに海水および培地中に含まれる微量の DA を検出するため、ODS 固相抽出カートリッジカラムによる DA の濃縮法を検討した。ODS 固相抽出カラムの平衡化、洗浄および試料を 50 mM ギ酸, 2 mM ギ酸アンモニウム溶液にすることにより、ODS 固相抽出カートリッジカラムに効率良く DA が保持されることが明らかになった。LC/MS/MS 分析により、広島県で採集した *P. multiseriata*, *P. multistriata* の二種の培養株から DA が検出され、細胞あたりの毒生産量は 0.57 ~ 1.20 pg/cell と微量であった。また、わが国沿岸の *P. multistriata* から DA を検出した事例はなく、本研究により初めて毒生産能が確認され、有毒種のモニタリングに有益な知見となった。

第 4 章では底生有毒渦鞭毛藻 *Ostreopsis ovata* が生産する PLTX 類縁体の OVTX 群について、本邦沿岸で採集した *O. ovata* の培養株のメタノール抽出液を LC/MS/MS を用いて解析した。イタリア地中海で採集された *O. ovata* 培養株のメタノール抽出液と比較し、本邦沿岸で採集した *O. ovata* の培養株に含まれる OVTX 群は溶出



時間が異なることから、イタリア地中海の *O. ovata* が生産する OVTX 群の異性体であることが明らかとなった。本邦沿岸で採集した *O. ovata* が生産する新規 PLTX 類縁体を特徴的なフラグメントイオンにより検索すると共に、主要成分である OVTX-aAC について、LC/QTOFMS 分析により得た MS/MS スペクトルから構造解析を行った。PLTX 標準品および OVTX-aAC の MS/MS スペクトルから本邦沿岸の *O. ovata* が生産する OVTX-aAC は C16-C20 および C53-C73 の間からヒドロキシ基が 1 つ欠損している構造を有すると推測した。

以上のように本研究において、わが国で頻発する下痢性・脂溶性貝毒の LC/MS 分析におけるカートリッジカラムによる簡易前処理法および OA 群の自動前処理蛍光 HPLC 分析法の開発により、高感度かつ精確な定量法を確立した。また、LC/MS/MS 分析による様々な測定手法を用いて、わが国において食中毒の発生例のない記憶喪失性貝毒 DA を生産する *Pseudo-nitzschia* 属や PLTX 類縁体を生産する *Ostreopsis* 属の生産毒を解析した。固相抽出カートリッジカラムによる海水・培地中の微量な DA を濃縮し、LC/MS/MS 分析により検出する手法は DA 生産藻の監視に非常に有用である。また、本邦において DA の生産能が確認されていなかった *P. multistriata* から初めて DA を検出した。さらに日本沿岸域に生息する *O. ovata* から LC/MS/MS 分析および LC/QTOFMS 分析によって、多種の新規 OVTX 類縁体の存在を明らかにした。

本論文はこれらの結果を取りまとめたものであり、本論文の一部については既に以下のように学会での口頭発表および学術論文として公表済みである。

(学術論文)

Hajime Uchida, Ryuichi Watanabe, Ryoji Matsushima, Naoyuki Uchida, Hiroshi Nagai, Michiya Kamio, Masakazu Murata, Takeshi Yasumoto, Toshiyuki Suzuki. (2014) A Convenient HPLC Method for Detection of Okadaic Acid Analogs as 9-Anthrilmethyl Esters with Automated Sample Cleanup by Column Switching. *Journal of AOAC International*. **97** (2) 391-397

Toshiyuki Suzuki, Ryuichi Watanabe, Hajime Uchida, Ryoji Matsushima, Hiroshi Nagai, Takeshi Yasumoto, Takamichi Yoshimatsu, Shinya Sato, Masao Adachi. (2012) LC-MS/MS analysis of novel ovatoxin isomers in several *Ostreopsis* strains collected in Japan. *Harmful Algae*. **20** 81-91

(学会発表)

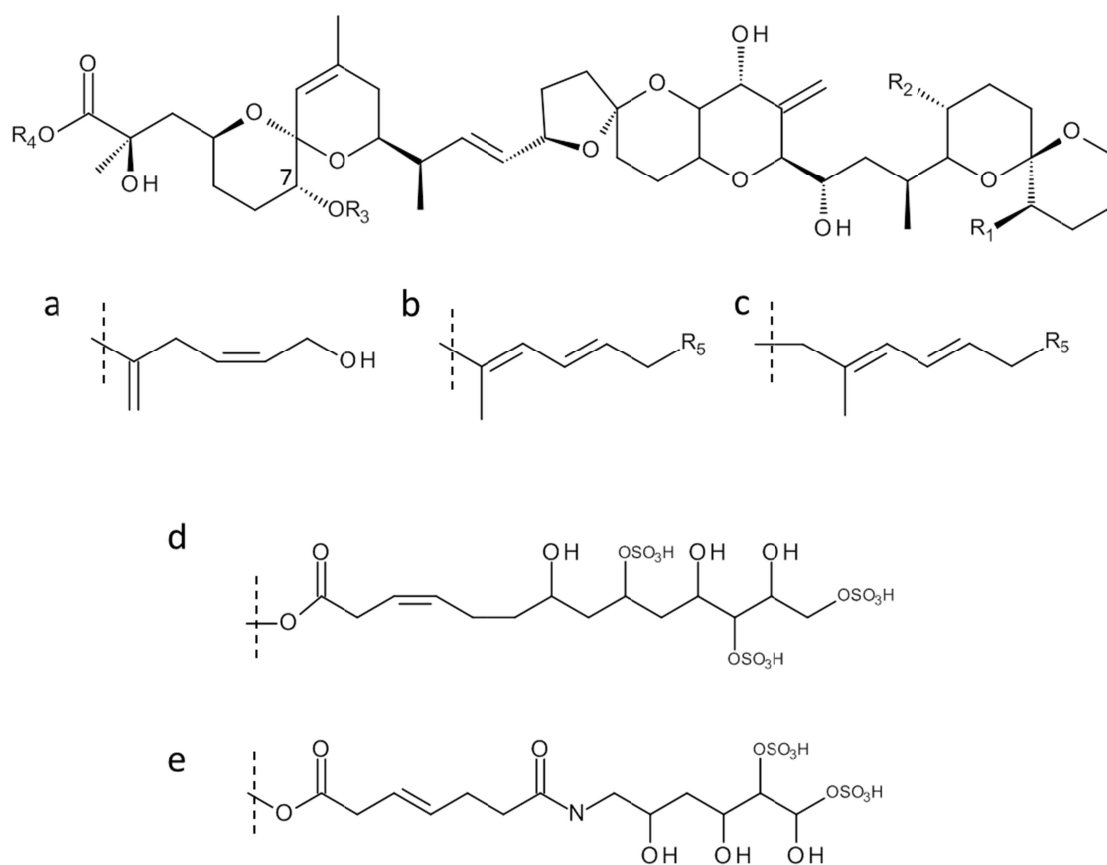
「下痢性・脂溶性貝毒の LC/MS 分析における固相抽出による前処理法」内田 肇・杉澤百合絵・松嶋良次・渡邊龍一・神尾道也・永井宏史・鈴木敏之 2014 年度 日本水産学会秋季大会

「下痢性・脂溶性貝毒の LC/MS 分析におけるマトリックスの影響」内田 肇・杉澤百合絵・松嶋良次・渡邊龍一・神尾道也・永井宏史・鈴木敏之 2014 年度 日本水産学会春季大会

図 表

Table.1 Seafood poisoning by shellfish contaminated with algal toxins.

Poisoning	Causative toxins	Production algae
Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP)	Okadaic acid group	<i>Dinophysis</i> spp., <i>Prorocentrum</i> spp.
Paralytic Shellfish Poisoning (PSP)	Saxitoxin group	<i>Alexandrium</i> spp., <i>Gymnodium catenatum</i>
Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)	Domoic acid group	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp., <i>Nitzschia</i> spp. <i>Amphora</i> spp.
Neurotoxic Shellfish Poisoning (NSP)	Brevetoxin group	<i>Karenia brevis</i>
Azaspiracid Shellfish Poisoning (AZP)	Azaspiracid group	<i>Azadinium spinosum</i>



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
OA	H	CH <sub>3</sub>		H	–
DTX1	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>		H	–
DTX2	CH <sub>3</sub>	H		H	–
DTX3	(H or CH <sub>3</sub> )	(H or CH <sub>3</sub> )	Acyl (fatty acid)	H	–
OA-D7a	H	CH <sub>3</sub>		a	–
OA-D7b	H	CH <sub>3</sub>		b	OH
OA-D8	H	CH <sub>3</sub>		c	OH
DTX4	H	CH <sub>3</sub>		c	d
DTX5a	H	CH <sub>3</sub>		b	e
DTX5b	H	CH <sub>3</sub>		c	e

Fig.1 Chemical structures of okadaic acid and dinophysistoxin analogues.

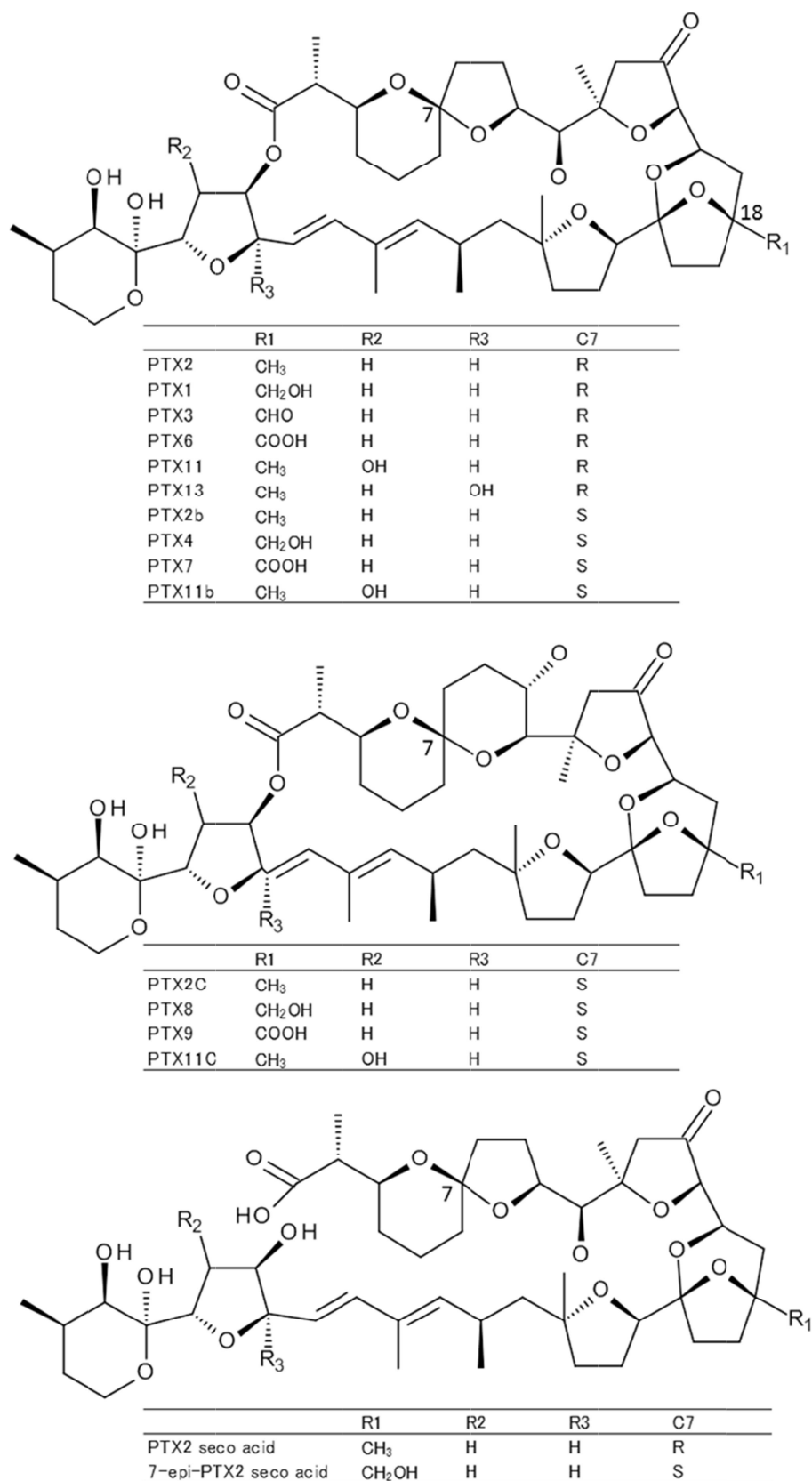


Fig.2 Chemical structures of pectenotoxin analogues.

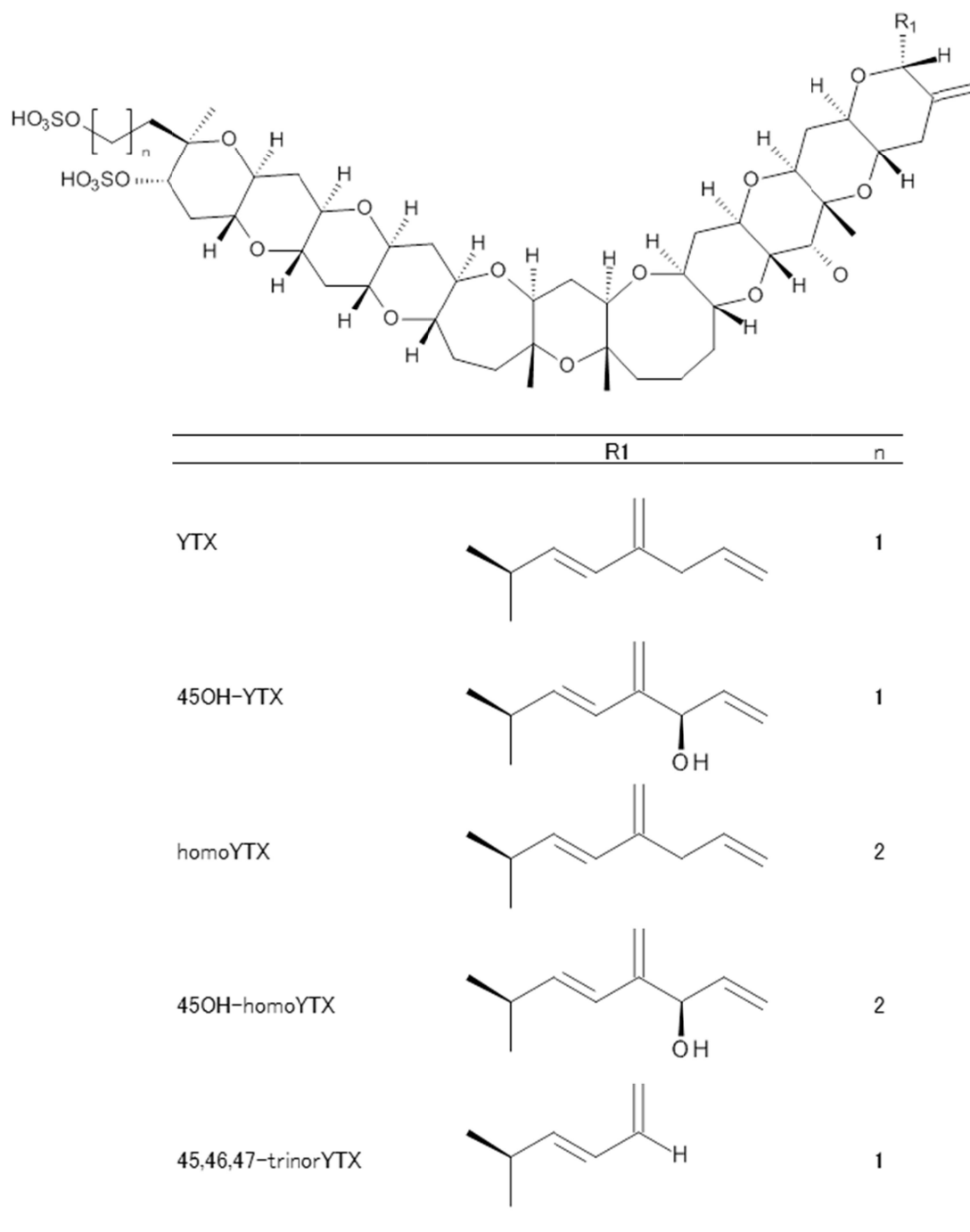


Fig.3 Chemical structures of yessotoxin analogues.

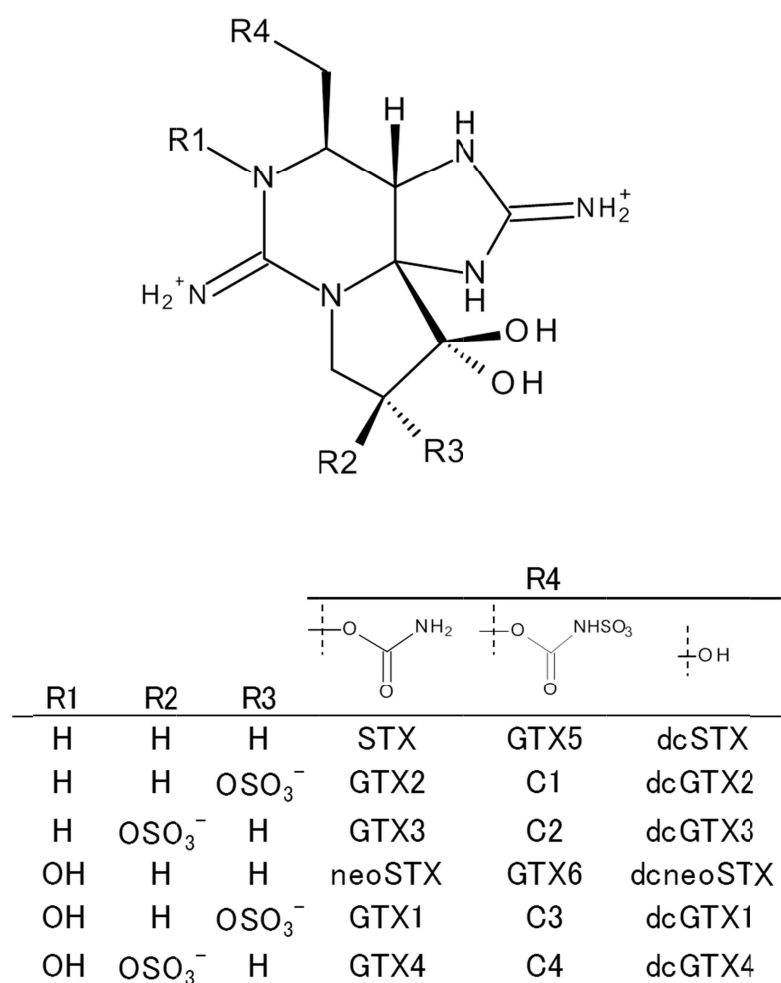


Fig.4 Chemical structures of saxitoxin analogues.

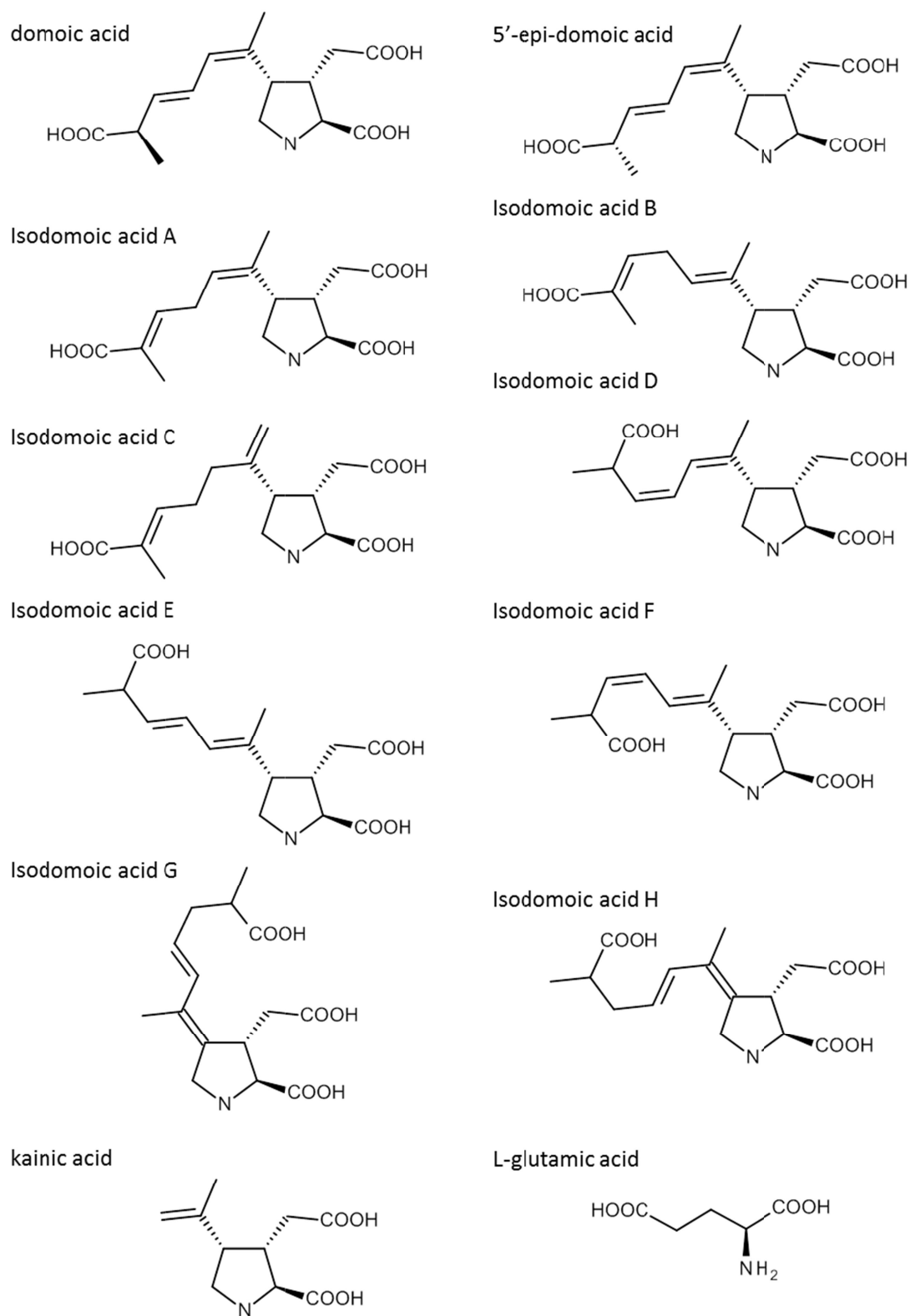
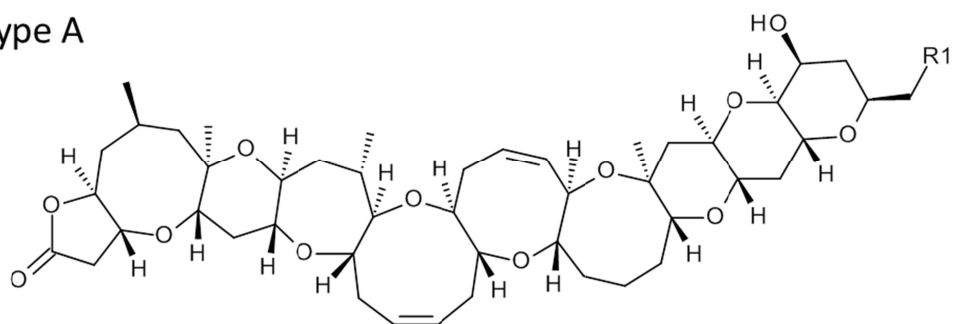


Fig.5 Chemical structures of domoic acid analogues, kainic acid and glutamic acid.

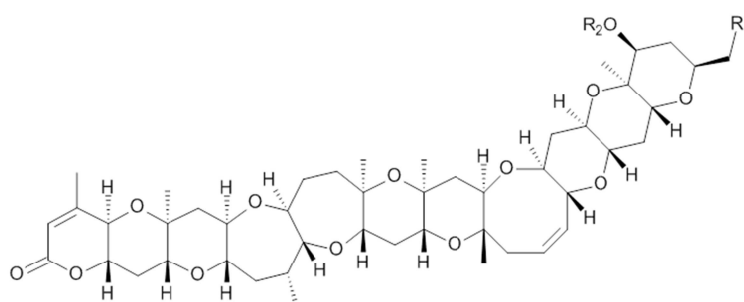


Type A



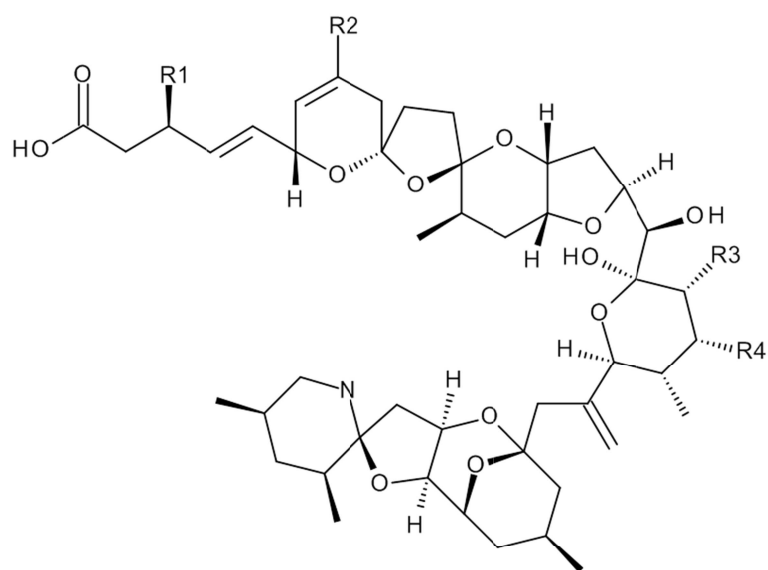
	PbTx-1	PbTX-7	PbTx-10
R1			

Type B



	R1	R2
PbTx-2		H
PbTx-3		H
PbTx-5		
BTXB1		H
BTXB2		H

Fig.6 Chemical structures of Brevetoxin analogues.



	R1	R2	R3	R4
AZA1	H	H	CH <sub>3</sub>	H
AZA2	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
AZA3	H	H	H	H
AZA4	OH	H	H	H
AZA5	H	H	H	OH

Fig.7 Chemical structures of Azaspiracid analogues.

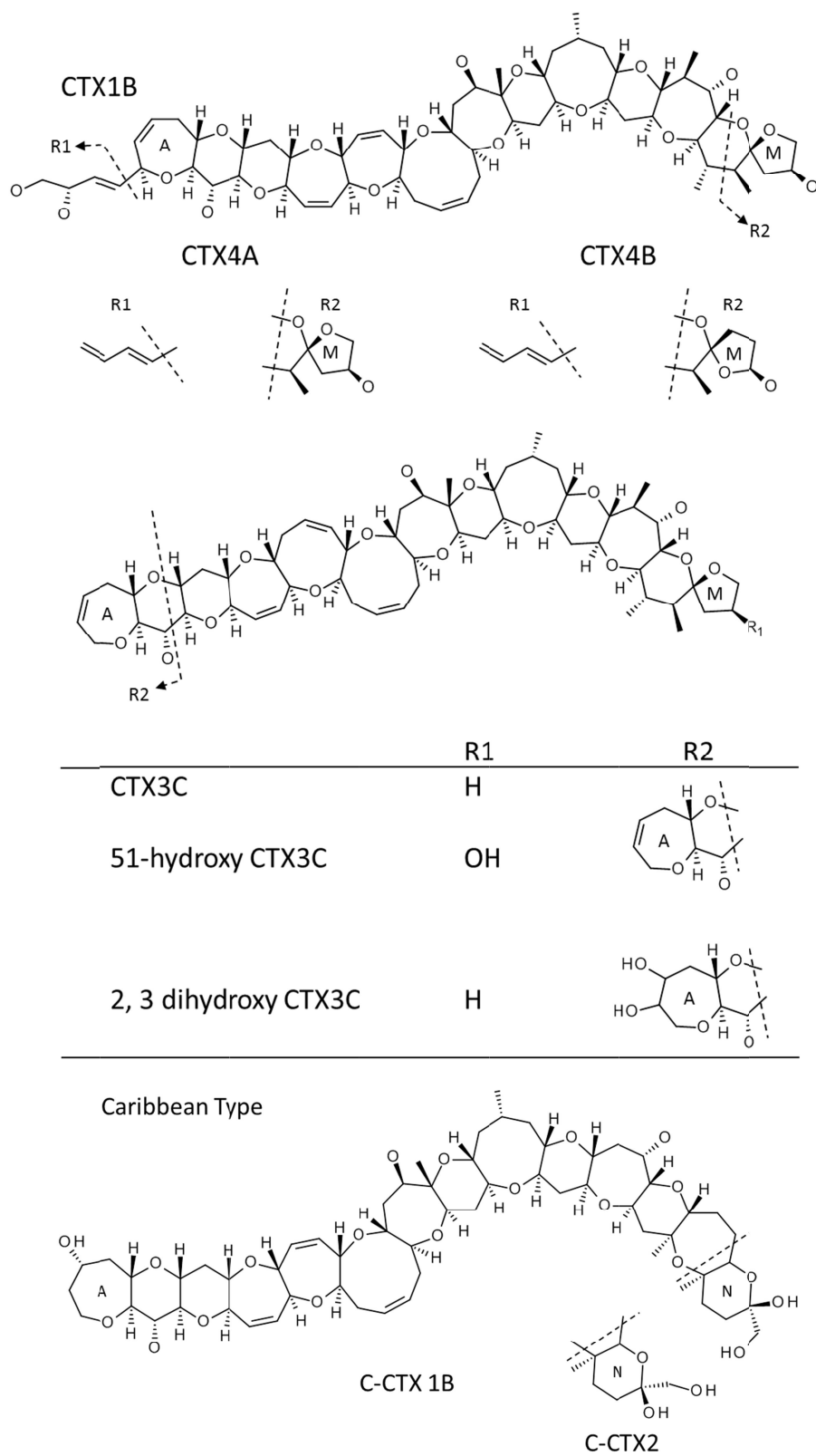
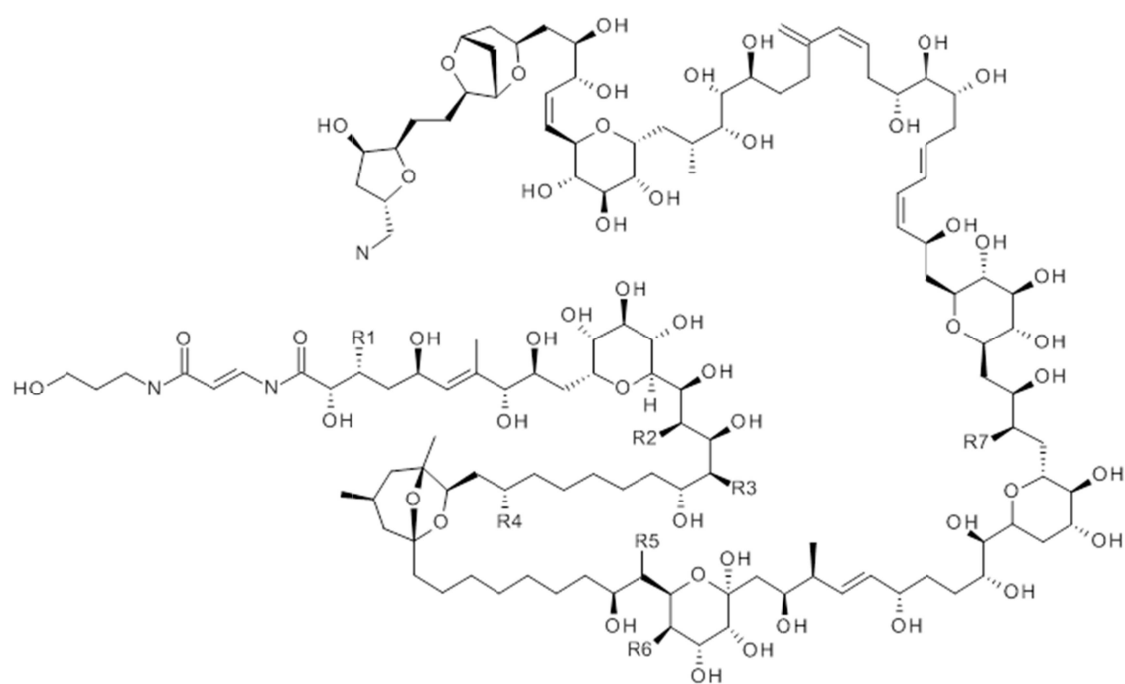


Fig.8 Chemical structures of ciguatoxin analogues.



	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
Palytoxin	CH <sub>3</sub>	OH	OH	CH <sub>3</sub>	H	OH	OH
42OH-Palytoxin	CH <sub>3</sub>	OH	OH	CH <sub>3</sub>	OH	OH	OH
Ostreocin D	H	OH	H	H	OH	H	OH
Ovatoxin a	CH <sub>3</sub>	H	OH	CH <sub>3</sub>	OH	H	H

Fig.9 Chemical structures of Palytoxin analogues.

## 第 1 章

### 下痢性・脂溶性貝毒の LC/MS 分析におけるマトリックス効果に関する研究

LC/MS 分析を用いた定量分析は、試料に由来する夾雑物（マトリックス）の影響によって、イオン化が抑制または促進し、目的化合物の定量値に大きな影響を与えるマトリックス効果が問題となる。このマトリックス効果は下痢性・脂溶性貝毒の LC/MS 法においても報告されており、LC/MS 法を貝毒検査に導入するためには、マトリックス効果を受けない分析条件や前処理法の検討が必要となっている。本章では下痢性・脂溶性貝毒の LC/MS 法による定量分析において、カートリッジカラムを用いた簡易的な前処理法を検討し、マトリックスの影響を受けない LC/MS 分析法を確立した。

## 試料および方法

### 試料

2012 年 7 月に宮城県女川湾で採集したホタテガイおよび 2012 年 7 月に広島県広島湾で採集したムラサキイガイを用いた。ホタテガイおよびムラサキイガイは中腸線を含む可食部を -25 °C で冷凍し保管した。

### 試薬

メタノールおよびアセトニトリルは高速液体クロマトグラフィー用を用い、99%酢酸(和光純薬工業，大阪)は特級を使用した(和光純薬工業，大阪)。98%ギ酸およびギ酸アンモニウム(ナカライテスク，京都)は精密分析用を用いた。30%アンモニア水(関東化学，東京)は特級を用いた。超純水は、EASY Pure® RODI System(Barnstead, USA)により製造した。

### 下痢性・脂溶性貝毒標準品

貝毒標準品のオカダ酸(OA)，ジノフィシストキシン-1 (DTX1)，ペクテノトキシン-1 (PTX1)，ペクテノトキシン-2 (PTX2)，ペクテノトキシン-6 (PTX6)，イエツソトキシン (YTX) 各 20 µg をメ

タノール 1 mL に溶解し、各標準品 50  $\mu$ L を合わせ窒素ガスにより風乾し、下痢性・脂溶性貝毒標準品混合物 1  $\mu$ g を調製した。

#### 検量線

下痢性・脂溶性貝毒標準品混合物 1  $\mu$ g をメタノール 1 mL に溶解し、メタノールで 2.5, 10, 25, 50, 100, 200 ng/mL に希釈し、下痢性・脂溶性貝毒検量線用標準液とした。検量線は試料分析の前後に標準液を測定し作成した。

#### 二枚貝抽出液の調製

冷凍保存したホタテガイまたはムラサキイガイは解凍し、中腸腺を含む可食部 200 g 以上をハンドブレンダーで細断し、ホモジナイザーによって均一なホモジネイトを調製した。各二枚貝ホモジネイト  $1 \pm 0.05$  g に対し 9 mL の 90% メタノール/水 (9:1, v/v) を加えホモジナイザーで 1 分間抽出した。抽出した試料は遠心分離機より室温で 3 分間 2000 g で遠心分離を行い、上清を 2 mL バイアルに入れ LC/MS 分析用の試料とした。

#### 下痢性・脂溶性貝毒添加試料の調製

添加回収試験は高濃度および低濃度の 2 濃度で行った。二枚貝ホモジネイト  $1 \text{ g} \pm 0.05 \text{ g}$  に対し、高濃度添加として OA 群および PTX 群は下痢性・脂溶性貝毒の基準値である 160 ng, YTX は定量限界の約 10 倍の 1000 ng 添加した。低濃度添加として OA 群および PTX 群は 50 ng, YTX は 100 ng 添加した。添加試料の調製は添加から抽出まで 5 回行い、繰り返し分析の精度や真度を算出した。

#### LC/MS 分析

液体クロマトグラフは Agilent 1200 モデル (Agilent technology, USA) を使用し、ハイブリットトリプル四重極/リニアイオントラップ質量分析計は 3200 Qtrap (AB Sciex, USA) を使用した。

LC/MS 移動相のストック溶液は 98% ギ酸 11.74 g およびギ酸アンモニウム 0.63 g を秤量し、超純水に溶解し 250 mL にメスアップした後、pH を 30% アンモニア水を用いて  $\text{pH } 2.30 \pm 0.05$  に調整し、これを LC/MS 分析の移動相を調製するためのストック溶

液とした。ストック溶液は冷蔵で保管し 1 か月以内に使用した。移動相は A 液として 50 mM ギ酸, 2 mM のギ酸アンモニウムを含む超純水(超純水 475 mL : ストック溶液 25 mL, v/v)、B 液として 50 mM ギ酸, 2 mM のギ酸アンモニウムを含む 95% アセトニトリル(アセトニトリル 475 mL : ストック溶液 25 mL, v/v)の 2 相を用いた。カラムは Hypersil BDS C8 (粒径 3 $\mu$ m)  $\phi$ 2.1 $\times$ 50 mm (Thermo Scientific, USA)を使用した。カラム温度を 20  $^{\circ}$ C に保ち、グラジエント条件は 10 分間で 20% B から 100% B にし、15 分間 100% B を流速 0.2 mL/min で下痢性・脂溶性貝毒を分離した。カラムの平衡化は 20% B を 13 分間流し行なった。

MS のイオン化はエレクトロスプレーイオン化法(ESI)を用い、陰イオンモードの選択イオンモニタリング(SIM)によって測定した。イオンチャンネルとして[M-H]<sup>-</sup>の OA:*m/z* 803.5; DTX1:*m/z* 817.5; PTX1:*m/z* 873.5; PTX2:*m/z* 857.5; PTX6:*m/z* 887.5; YTX:*m/z* 1141.5 を検出した。

検量線用標準品および試料の注入は、検量線用標準品を低濃度から順に測定し、標準品測定後にブランクとしてメタノールを注入した。試料 5 検体につき 1 度 Quality control (QC)として中間濃度の標準品を測定した。試料分析の後、再度ブランクとしてメタノールを注入し、低濃度から順に検量線用標準品を測定した。

#### カートリッジカラムによるマトリックス効果原因物質の除去

逆相カートリッジカラムとして、Sep Pak plus Diol, Sep Pak plus tC2 (Waters, USA), Captiva ND<sup>Lipids</sup> single tube 3mL (Agilent technology, USA), Discovery CN SPE 50 mg (Supelco, USA)を用いた。陽イオン交換基を含むカートリッジカラムとして、Oasis MCX plus, Oasis WCX plus(Waters, USA), Elut Bond PRS 50 mg, Elut Bond SCX 50 mg(Agilent technology, USA)を用いた。

ムラサキイガイ抽出液を以上のカートリッジカラムに通すことにより、マトリックス効果原因物質の除去を試みた。Captiva ND Lipids および Discovery CN は 1 mL の抽出液を通し、担体量の多い SepPak plus Diol, SepPak plus tC2 は 2 mL の抽出液をカートリッジカラムに通した。陽イオン交換基を含むカートリッジカラムにムラサキイガイ抽出液を通す際には、抽出液 1 mL に対してあらかじめ酢酸を 1  $\mu$ L 加え pH を調整した。Elut Bond PRS および

Elut Bond SCX はムラサキイガイ抽出液 1 mL、担体量の多い Oasis MCX plus, Oasis WCX plus は 2 mL をカートリッジカラムに通した。各カートリッジカラムを通液したムラサキイガイ抽出液をムラサキイガイ前処理液とした。

下痢性・脂溶性貝毒 25 ng をムラサキイガイ前処理液 500  $\mu$ L に溶解し、LC/MS 分析により定量した。カートリッジカラムによるイオン化促進物質の除去効果は回収率から評価した。

#### 固相抽出前処理法の添加回収実験

下痢性・脂溶性貝毒標準品 1  $\mu$ g をムラサキイガイおよびホタテガイ抽出液 20 mL に溶解し、下痢性・脂溶性貝毒添加試料 (50 ng/mL) とした。下痢性・脂溶性貝毒添加試料 1 mL を Captiva ND Lipids に供した。また陽イオン交換基を含む Oasis MCX plus による前処理は下痢性・脂溶性貝毒添加試料 2 mL に対し、酢酸を 2  $\mu$ L 加え、Oasis MCX plus に供した。Captiva ND Lipids および Oasis MCX plus によって前処理した下痢性・脂溶性貝毒添加試料について LC/MS 分析より定量し、本前処理法の回収率を求めた。操作は繰り返し 3 回行い、相対標準偏差(RSD%)より本法によるバラツキを求めた。

### 結果および考察

#### 下痢性・脂溶性貝毒の SIM 分析

下痢性・脂溶性貝毒の中間濃度標準品(50 ng/mL)のクロマトグラムを(Fig.10)に示す。ムラサキイガイ試料の 90%メタノール抽出液については、下痢性・脂溶性貝毒いずれの成分も検出限界以下であった。ホタテガイ試料については PTX6 が含まれていた(Fig.11)。市場に流通している規制基準値以下のホタテガイからも PTX6 が検出されるため、ホタテガイは PTX6 を長期間保持すると推察された。PTX6 を含まないホタテガイ試料を入手することは困難であったため、PTX6 の添加回収実験における回収率は、試料として用いたホタテガイがあらかじめ有していた PTX6 含量を差し引くことにより回収率を算出した。

検量線用標準液(2.5~200 ng/mL)を測定したピークエリアから、



各毒の検量線を作成した(Fig.12)。下痢性・脂溶性貝毒の検量線について 0.98 以上の相関係数が得られた。

#### LC/MS 分析における二枚貝マトリックスの影響

添加試料の定量値から回収率を算出し、調製した 5 検液の回収率から相対標準偏差(RSD%)を算出した(Table.2)。試料分析 5 検体に一度測定した Quality control についても回収率を算出し、精度を確認した(Table.3)。添加試料の回収率は 100%を超えており、陰イオンモードの LC/MS 分析において、ホタテガイおよびムラサキイガイ試料中の下痢性・脂溶性貝毒は、イオン化が促進される傾向が見られた。また、Quality control についても回収率が高くイオン化が促進していることから、カラムに強く保持され残存したマトリックス中に、イオン化を促進する物質が含まれていることが明らかになった。陰イオンモードにおける下痢性・脂溶性貝毒の測定では、 $[M-H]^-$ や $[M+HCOOH-H]^-$ に相当するイオンを検出している。これらのイオンの生成を促進する化合物としてプロトン受容体である塩基性化合物が推察される。また、逆相分配カラムに強く保持される化合物であることから、低極性化合物であることも推察された。以上の結果から、ホタテガイおよびムラサキイガイ試料中に含まれるイオン化を促進するマトリックス効果原因化合物は、塩基性かつ低極性の化合物であることが示唆され、この条件を満たす化合物を標的とした前処理条件の検討が有効であることが明らかになった。

#### カートリッジカラムによるマトリックス効果原因物質の除去効率

逆相分配カートリッジカラムにより前処理を行ったムラサキイガイ抽出液に毒を添加した試料の回収率を(Table.4)に示す。添加回収実験における回収率の性能基準は 70-120%である。全ての下痢性・脂溶性貝毒に対して、この性能基準を満たす回収率が得られたカートリッジカラムは Captiva ND<sup>Lipids</sup>のみであった。次に陽イオン交換基を含むカートリッジカラムにより前処理を行ったムラサキイガイ抽出液に毒を添加した試料の回収率を(Table.5)に示す。定量分析法において要求される回収率の性能基準である 70-120%を満たすカートリッジカラムは OA 群(OA,DTX1)においては Oasis MCX plus のみであった。また、YTX については、

全てのカラムが性能基準を満たした。一方、PTX 群については、Bond Elute SCX 及び Oasis MCX plus において回収率は顕著に低下した。Oasis MCX plus カラムで処理をした試料の LC/MS クロマトグラムを (Fig.13) に示す。PTX 異性体のピークが検出され、Oasis MCX plus 及び Bond Elute SCX で前処理をしたムラサキイガイ抽出液における PTX 群の回収率の低下は、異性化によるものと推察された。

陽イオン交換基を含む固相抽出前処理液による PTX 群の異性化の原因として、PTX 群は酸触媒によりケト-エノール互変異性によりスピロケタール異性体が生じることが知られている (Toshiyuki Suzuki *et al.* 2014)。陽イオン交換基から生じたプロトンにより PTX 群は異性化したと考えられる。

以上の結果から、Captiva ND<sup>Lipids</sup> および Oasis MCX plus について添加回収実験により、下痢性・脂溶性貝毒の LC/MS 分析における前処理法としての有効性について次節で検証した。

#### 添加回収実験によるカートリッジカラム前処理法の検証

下痢性・脂溶性貝毒を添加した二枚貝抽出液を Captiva ND<sup>Lipids</sup> および Oasis MCX plus により前処理を行った試料の回収率を (Table.6) に示す。Captiva ND<sup>Lipids</sup> の前処理においては、OA 群および PTX 群について、ホタテガイ・ムラサキイガイのマトリックスの影響は殆どなく、Captiva ND<sup>Lipids</sup> に対しての保持も見られなかった。その結果、良好な回収率が得られた。一方、YTX は回収率が約 60~75% と低く、Captiva ND<sup>Lipids</sup> に一定割合の YTX が保持され溶出しないために回収率が低下したと考えられた。Oasis MCX plus による前処理では、前処理液に直接毒を添加した結果と同様に PTX 群の異性化が見られたが、OA 群および YTX についてはマトリックス効果によるイオン化の促進は改善された。以上の結果から、Captiva ND<sup>Lipids</sup> および Oasis MCX plus はどちらも下痢性貝毒 (OA, DTX1) に対しては、マトリックス効果の原因となるイオン化促進物質を除去できることが明らかとなった。

PTX 群や YTX 群はヒトに対する中毒事例がなく、またマウス経口投与による毒性が極めて低いことから、Codex により検討されている海洋生物毒の基準値において規制の対象から外れてい

る。そのため、機器分析による下痢性・脂溶性貝毒の検査において、最も重要な分析種は OA 群と考えられている。わが国においては、機器分析法の導入により、OA 群のみの規制体制に向けて検討が行われている。今後、LC/MS 法により下痢性貝毒の監視や検査を行う際には、Captiva ND<sup>Lipids</sup> および Oasis MCX plus による試料の前処理法により、LC/MS 分析による定量の精確さを大幅に改善させることが可能である。本前処理法の普及により、LC/MS 分析による OA 群検査の信頼性が向上すると考えられる。一方、EU などの一部の国や地域においては、PTX 群や YTX 群は規制基準値を緩和しつつも、規制対象として監視を続けている。これらの化合物の LC/MS 法による定量において、マトリクス効果による定量阻害を改善するための有効な前処理法は未だに報告されていない。本研究で検討した Oasis MCX plus による前処理法は OA 群、YTX 群の測定精度改善において有効であり、PTX 群においても前処理により生じた異性体も含めた定量を検討することにより、回収率の改善が見込めるため、下痢性・脂溶性貝毒の LC/MS 法における前処理法として有望と考える。

图表

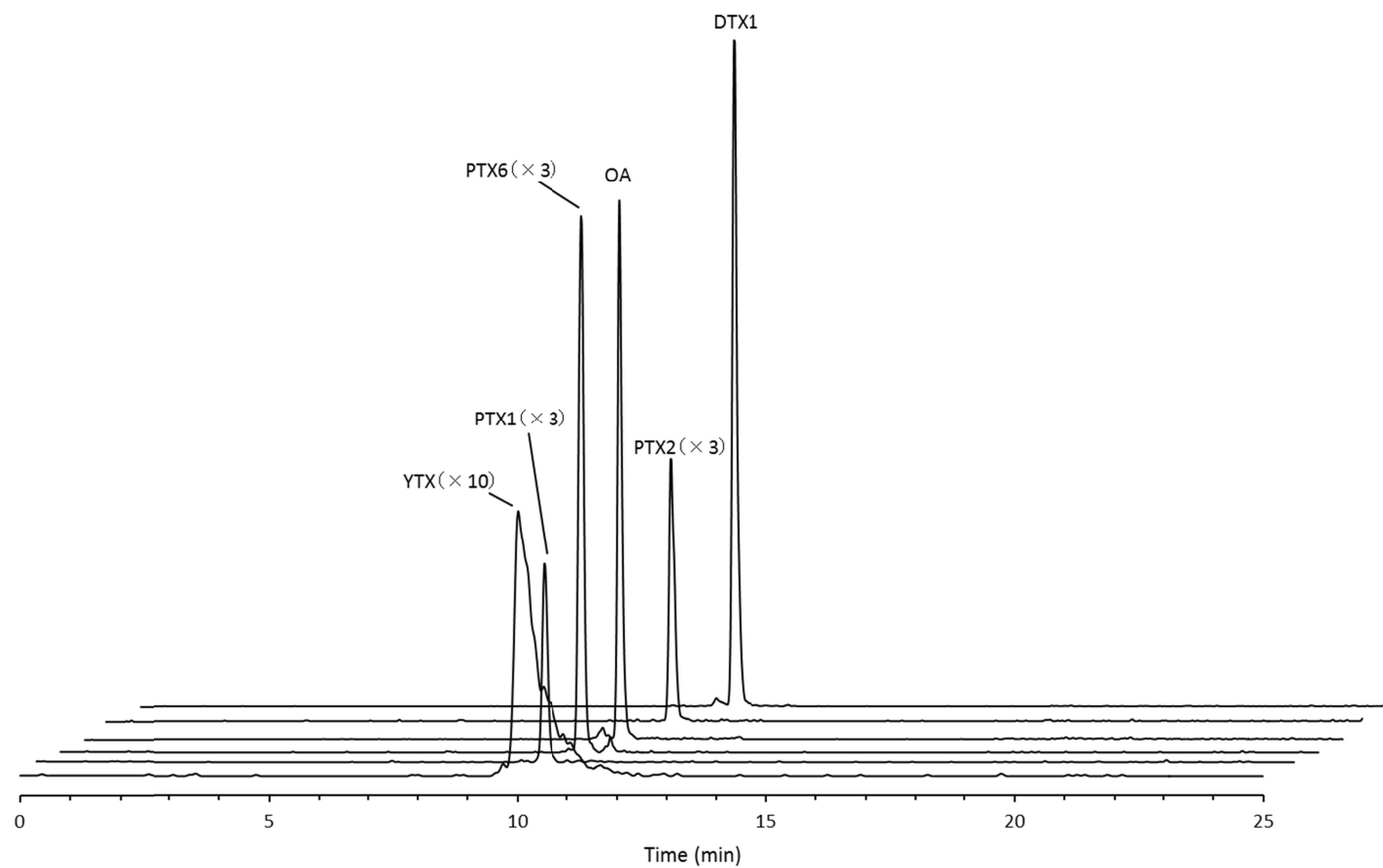


Fig.10 SIM LC/MS chromatogram of authentic diarrhetic shellfish toxins and other lipophilic shellfish toxins.

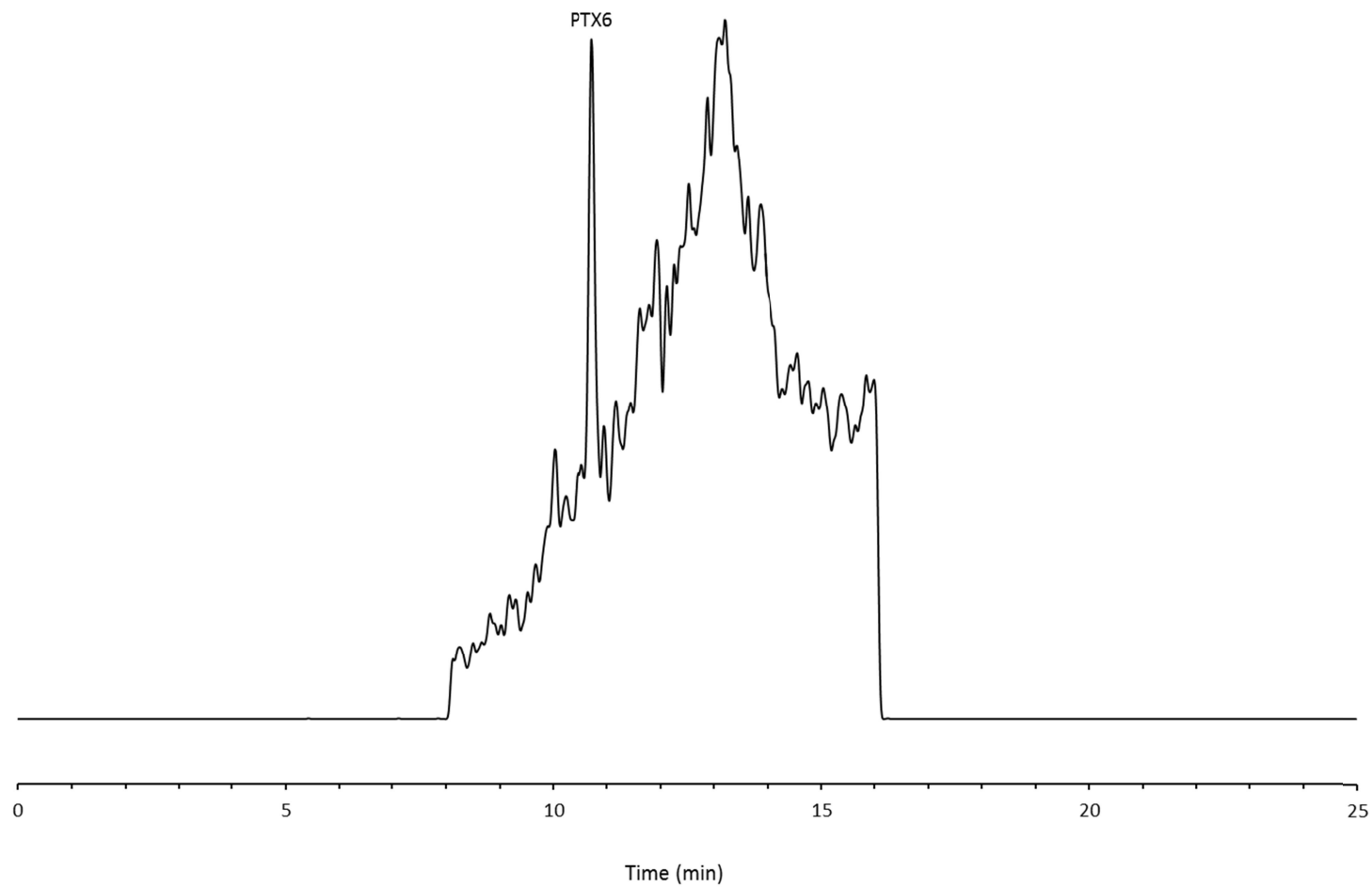


Fig.11 SIM LC/MS chromatogram of endogenous PTX6 in 90% methanol extract of scallops.

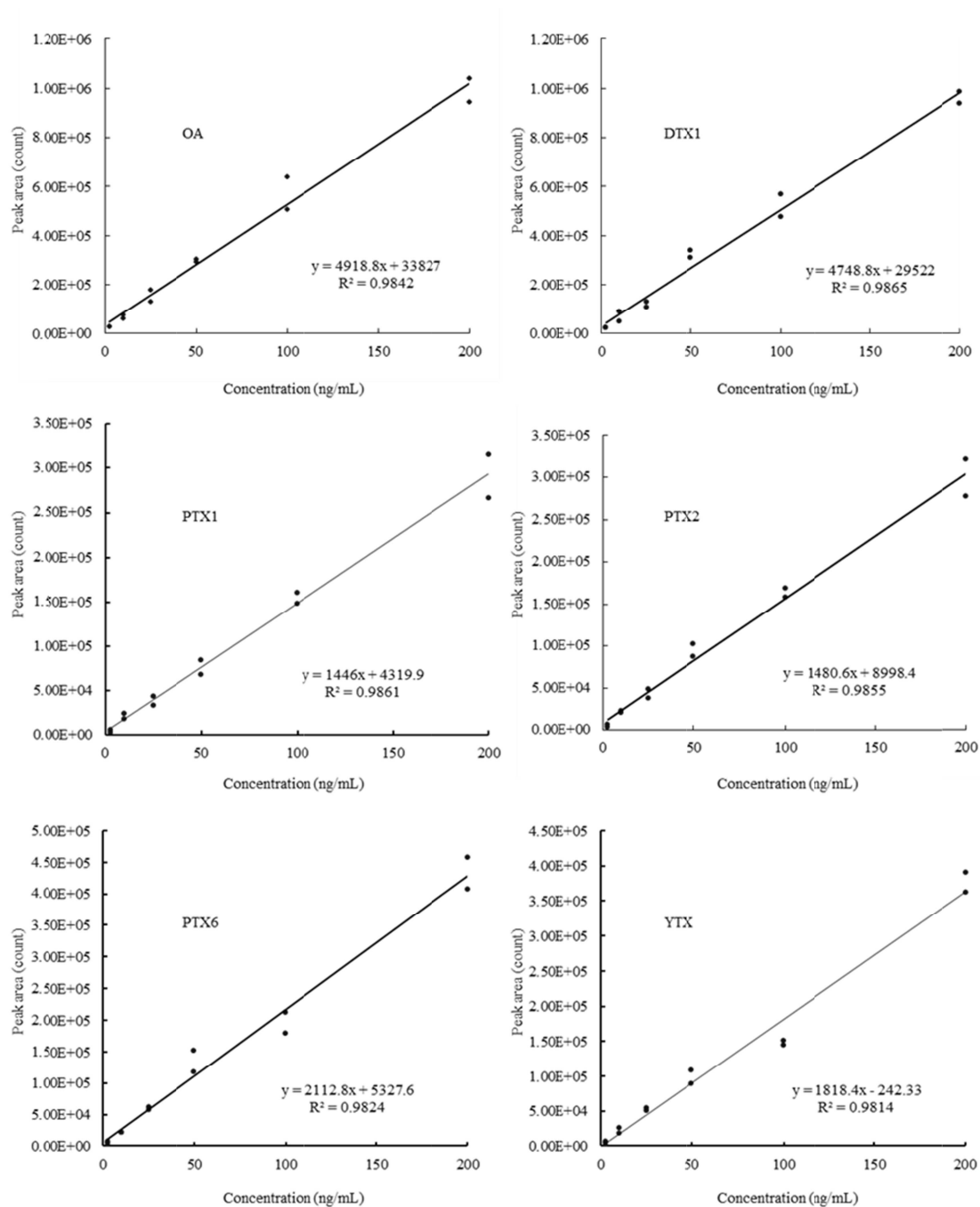


Fig.12 Calibration curve of authentic diarrhetic shellfish toxins and lipophilic shellfish toxins.

Table.2 Recovry of diarrhetic shellfish toxins and other lipophilic toxins from mussels and scallops extracts.

High concentration						
Recovery (%)						
Mussels	OA	DTX1	PTX1	PTX2	PTX6	YTX
#1	113	170	129	163	138	105
#2	134	184	129	112	138	112
#3	143	208	110	153	129	103
#4	128	194	141	153	135	114
#5	129	178	117	157	117	113
Average recovery (%)	129	187	125	148	131	109
RSD (%)	9	8	10	14	7	5

Recovery (%)						
Scallops	OA	DTX1	PTX1	PTX2	PTX6	YTX
#1	131	205	123	114	111	100
#2	136	177	120	116	97	102
#3	151	213	113	166	116	119
#4	168	185	121	149	133	113
#5	152	178	135	143	86	103
Average recovery (%)	147	192	122	138	109	107
RSD (%)	10	9	6	16	17	8

Low concentration						
Recovery (%)						
Mussels	OA	DTX1	PTX1	PTX2	PTX6	YTX
#1	123	146	106	159	161	101
#2	159	172	135	168	194	129
#3	112	142	134	182	170	111
#4	180	131	120	169	160	120
#5	150	151	129	165	119	95
Average recovery (%)	145	148	125	169	161	111
RSD (%)	19	10	10	5	17	12

Recovery (%)						
Scallops	OA	DTX1	PTX1	PTX2	PTX6	YTX
#1	159	175	119	126	115	121
#2	145	188	145	121	132	133
#3	107	185	118	154	84	123
#4	148	193	184	206	145	132
#5	134	166	109	164	155	130
Average recovery (%)	138	181	135	154	126	128
RSD (%)	14	6	22	22	22	4

Table.3 Accuracy of quality control obtained for standard diarrhetic shellfish toxin and other lipophilic shellfish toxin analyzed each five bivalve samples.

Quality control (STD 50 ng/mL)	OA	DTX1	PTX1	PTX2	PTX6	YTX
Accuracy(%)	125	165	112	122	125	117

Table.4 Recovery of diarrhetic shellfish toxins and other lipophilic toxins from mussel extracts treated with reversed-phase SPE.

	Recovery (%)					
	OA	DTX1	PTX1	PTX2	PTX6	YTX
Captiva ND <sup>Lipids</sup> _#1	104	122	97	95	106	97
Captiva ND <sup>Lipids</sup> _#2	95	103	93	108	117	108
Captiva ND <sup>Lipids</sup> _#3	111	105	95	98	109	100
Average recovery (%)	103	110	95	100	111	102
RSD%	8	10	2	7	5	6

	Recovery (%)					
	OA	DTX1	PTX1	PTX2	PTX6	YTX
Discovery CN_#1	224	124	93	105	123	118
Discovery CN_#2	197	118	101	103	128	92
Discovery CN_#3	222	118	105	95	116	86
Average recovery (%)	214	120	100	101	122	99
RSD%	7	3	6	5	5	17

	Recovery (%)					
	OA	DTX1	PTX1	PTX2	PTX6	YTX
Sep pak plus diol_#1	148	123	101	85	111	103
Sep pak plus diol_#2	150	132	91	107	113	108
Sep pak plus diol_#3	134	111	84	98	99	94
Average recovery (%)	144	122	92	97	108	102
RSD%	6	8	9	11	7	7

	Recovery (%)					
	OA	DTX1	PTX1	PTX2	PTX6	YTX
Sep pak plus tC2_#1	172	138	96	98	110	91
Sep pak plus tC2_#2	179	148	99	100	123	112
Sep pak plus tC2_#3	195	134	100	112	121	110
Average recovery (%)	182	140	98	103	118	104
RSD%	7	5	2	7	6	11



Table.5 Recovery of diarrhetic shellfish toxins and other lipophilic toxins from mussel extracts treated with cation-exchange SPE.

	Recovery (%)					
	OA	DTX1	PTX1	PTX2	PTX6	YTX
Bond elut PRS_#1	123	138	97	93	114	111
Bond elut PRS_#2	114	134	102	91	111	98
Bond elut PRS_#3	113	128	99	103	109	109
Average recover (%)	117	133	100	96	111	106
RSD%	4	4	3	7	3	7

	Recovery (%)					
	OA	DTX1	PTX1	PTX2	PTX6	YTX
Bond elut SCX_#1	111	131	53	55	51	100
Bond elut SCX_#2	104	124	59	55	47	97
Bond elut SCX_#3	117	132	55	63	46	102
Average recover (%)	111	129	56	58	48	100
RSD%	6	4	5	8	5	3

	Recovery (%)					
	OA	DTX1	PTX1	PTX2	PTX6	YTX
Oasis MCX plus_#1	111	111	58	64	55	118
Oasis MCX plus_#2	96	109	57	57	45	95
Oasis MCX plus_#3	101	103	51	51	40	96
Average recover (%)	103	108	55	57	47	103
RSD%	7	4	7	12	16	12

	OA	DTX1	PTX1	PTX2	PTX6	YTX
Oasis WCX plus_#1	131	142	87	80	95	118
Oasis WCX plus_#2	143	156	81	86	95	111
Oasis WCX plus_#3	129	126	82	78	98	106
Average recover (%)	134	141	83	81	96	112
RSD%	6	11	4	5	2	5

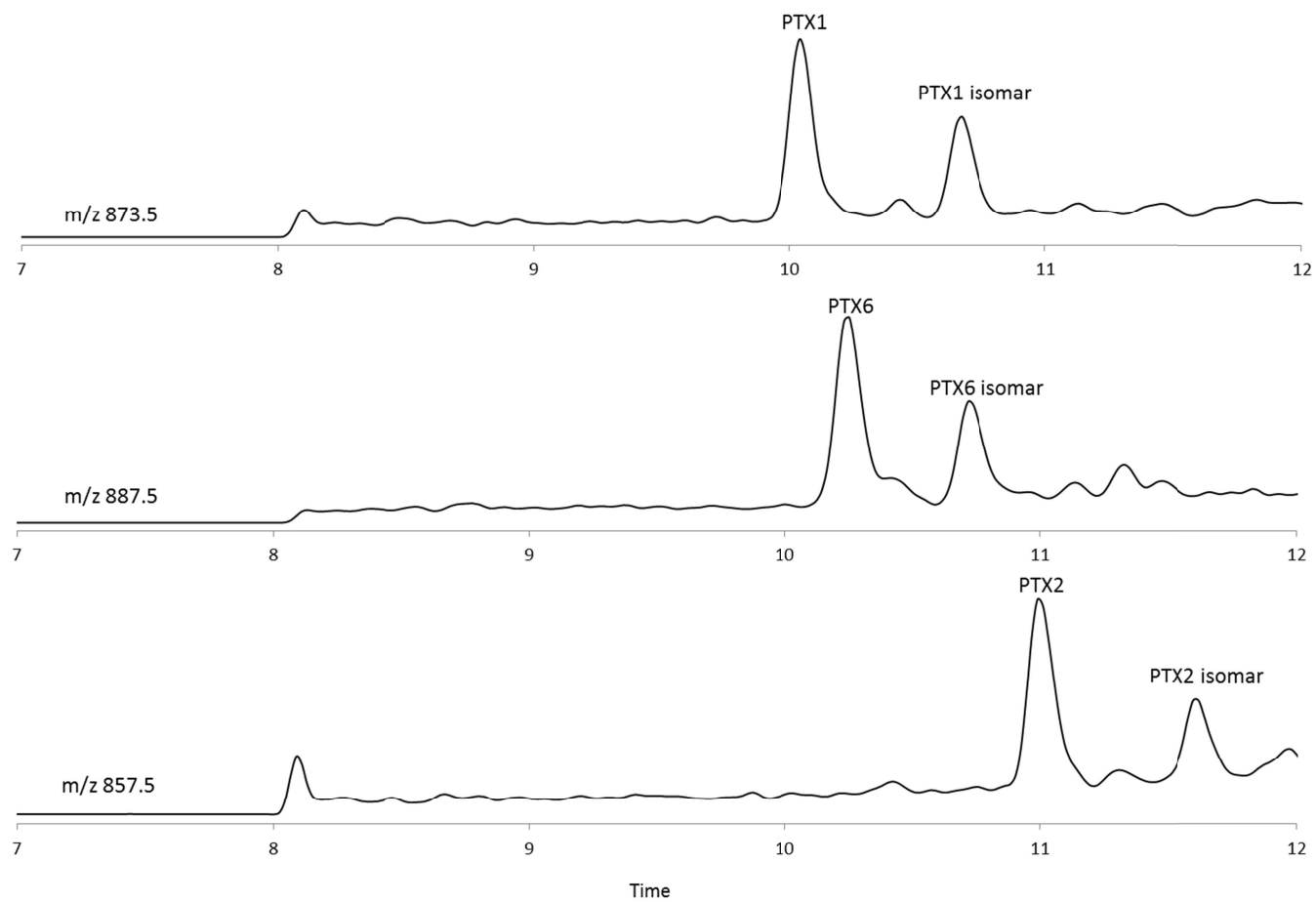


Fig.13 SIM LC/MS chromatogram of PTX analogues obtained from mussels extract passed through Oasis MCX plus.

Table.6 Recovery of diarrhetic shellfish toxin and lipophilic shellfish toxin fortified to bivalve extracts and passed thorough the Captiva ND Lipids & Oasis MCX plus pretreatment.

	Recovery (%)					
	OA	DTX1	PTX1	PTX2	PTX6	YTX
Mussels_Captiva ND <sup>Lipids</sup> _#1	92	99	97	83	94	76
Mussels_Captiva ND <sup>Lipids</sup> _#2	91	92	97	82	97	73
Mussels_Captiva ND <sup>Lipids</sup> _#3	91	92	89	84	98	73
Average recovery (%)	91	94	94	83	96	74
RSD%	1	4	5	2	2	3

	Recovery (%)					
	OA	DTX1	PTX1	PTX2	PTX6	YTX
Scallops_Captiva ND <sup>Lipids</sup> _#1	106	105	104	89	94	63
Scallops_Captiva ND <sup>Lipids</sup> _#2	100	116	94	90	104	72
Scallops_Captiva ND <sup>Lipids</sup> _#3	97	114	92	94	99	67
Average recovery (%)	101	112	97	91	99	68
RSD%	5	6	7	3	5	7

	Recovery (%)					
	OA	DTX1	PTX1	PTX2	PTX6	YTX
Mussels_Oasis MCX plus_#1	96	79	55	53	33	102
Mussels_Oasis MCX plus_#2	93	85	49	49	33	100
Mussels_Oasis MCX plus_#3	87	75	49	48	29	97
Average recovery (%)	92	80	51	50	32	99
RSD%	5	6	7	5	6	2

	Recovery (%)					
	OA	DTX1	PTX1	PTX2	PTX6	YTX
Scallops_Oasis MCX plus_#1	102	89	63	56	38	96
Scallops_Oasis MCX plus_#2	104	89	59	57	33	107
Scallops_Oasis MCX plus_#3	98	85	53	52	24	86
Average recovery (%)	101	88	58	55	32	96
RSD%	3	3	9	5	21	11

## 第 2 章

### 下痢性貝毒オカダ酸群の自動前処理蛍光 HPLC 分析法の確立

下痢性貝毒オカダ酸(OA)群はカルボキシ基を有しており、このカルボキシ基に対し蛍光化試薬を反応させた蛍光誘導体を HPLC により定量する手法が開発されている (Lee *et al.* 1987)。蛍光 HPLC 分析は LC/MS 分析と比較し、マトリックスの影響を受けにくい分析法であり、OA 群蛍光誘導体のピークの検出を妨害する様々な蛍光物質と完全分離することにより、高感度かつ精密な定量分析が可能である。そのためには、シリカカートリッジカラムによる煩雑な前処理が必要であり、前処理効率の再現性についても十分な検討が行われていないため、実用化には至っていない。本研究では OA 群の蛍光 HPLC 法についてカラムスイッチングを用いたオンライン前処理法を導入し、再現性と定量性を大幅に改良した自動前処理蛍光 HPLC 分析法を開発した。さらに、DTX3 などのエステル型 OA 群も含めた検出を可能とするために、エステル型 OA 群のアルカリ加水分解処理を含めた分析手順を検討し、OA 群検査における国際規格に適合した分析法を検討した。本法の妥当性を検証するために、天然で毒化したイガイ試料を対象に、本法および LC/MS 法による定量値を比較して相関性を明らかにした。

### 試料および方法

#### 試薬

メタノールおよびアセトニトリルは液体クロマトグラフィー用を用い、ヘキサンおよびクロロホルム、アセトンは特級を使用した(和光純薬工業, 大阪)。98%ギ酸およびギ酸アンモニウム(ナカライテスク, 京都)は精密分析用を用いた。30%アンモニア水(関東化学, 東京)は特級を用いた。カルボキシ基蛍光化試薬は遊離脂肪酸の分析試薬として開発された 9-Anthryldiazomethane (ADAM)を用いた(フナコシ, 東京)。塩酸および水酸化ナトリウム(関東化学, 東京)は特級を使用した。超純水は、EASY Pure® RODI System(Barnstead, USA)により製造した。

## 試料

添加回収実験用の試料として、OA 群が検出限界以下のホタテガイ、マガキ、ミドリイガイの 9 倍量 90%メタノール抽出液を用いた。天然で毒化した二枚貝試料として-25℃で冷凍保存した秋田県・山形県・新潟県で毒化したイガイの 90%メタノール抽出液 20 検体を用いた。

## 0.2% ADAM/メタノール溶液(w/v)

ADAM 2mg にアセトン 50  $\mu$ L および 950  $\mu$ L メタノールに溶解し、0.2%ADAM/メタノール溶液とした。

## 下痢性貝毒標準品

下痢性貝毒標準品のオカダ酸(OA)、ジノフィシストキシン-1 (DTX1) 20  $\mu$ g をそれぞれメタノール 1 mL に溶解し、OA および DTX1 標準品 50  $\mu$ L を分注し、合わせて窒素ガスにより風乾し、下痢性貝毒標準品 1  $\mu$ g とした。

## OA 群蛍光誘導体の標準品調製

下痢性貝毒標準品 1  $\mu$ g に 0.2% ADAM/メタノール溶液 200  $\mu$ L を加え溶解し、室温下の暗所にて 1 時間反応させ、OA 群の 9-anthrylmethyl(AM)エステルを調製した(Fig.14)。

オンライン前処理の条件検討に用いる標準品は 1 時間反応させた後に 35℃の N<sub>2</sub> ガスエバポレーターにより溶媒を除去した。残渣はヘキサン：クロロホルム(1 : 1, v/v) 300  $\mu$ L で 3 回洗いこみ、ヘキサン 5 mL でコンディショニングした Sep Pak Plus Silica Cartridge (Waters, USA)へ供した。ヘキサン：クロロホルム(1 : 1, v/v) 5 mL で洗浄し、次にクロロホルム 5 mL で洗浄した。クロロホルム：メタノール(95 : 5, v/v) 5 mL で ADAM 誘導体の AM-OA および AM-DTX1 を溶出させた。溶出液はロータリーエバポレーターにより溶媒を除去し、残渣に 1 mL のメタノールを加え、前処理条件検討用のシリカカートリッジ前処理 AM-OA・AM-DTX1 標準液とした。

自動前処理蛍光 HPLC 分析による定量に用いた標準品は、OA 群の 0.2%ADAM/メタノール反応液 200  $\mu$ L に 800  $\mu$ L のメタノールを加え、定量用 AM-OA・AM-DTX1 標準液(1  $\mu$ g/mL)とした。

### 二枚貝試料の抽出および蛍光誘導体の調製

二枚貝の可食部 1 g に 90%メタノール 9 mL を加え、ホモジナイザーにより抽出した。90%メタノール抽出液を 2000 g で 3 分間遠心分離し、上清を二枚貝抽出液とした。

二枚貝抽出液 200  $\mu$ L に 1.25M 水酸化ナトリウムを 50  $\mu$ L 加え 80°C で 30 分間加熱し、エステル型 OA 群の加水分解を行った。加水分解後、1.25M 塩酸を 55  $\mu$ L を加え、反応液の pH を酸性にした。加水分解物にヘキサン 200  $\mu$ L を加え攪拌し、2000 g で 5 分間遠心分離し、上層のヘキサンを除去した。ヘキサンによる液々分配は繰り返し 2 回行った。含水メタノール層に 80  $\mu$ L の超純水、320  $\mu$ L のクロロホルムを加え攪拌し、2000 g で 5 分間遠心分離した。OA 群が分配されるクロロホルム層を 1.5 mL ガラスチューブへ移した。再度含水メタノール層にクロロホルムを 320  $\mu$ L 加え攪拌し、分配したクロロホルム層を合わせた。

クロロホルム層を 35°C に保温し、N<sub>2</sub> ガスエバポレーターにより溶媒を除いた。完全に溶媒を除去したのち、0.2% ADAM/メタノール溶液 200  $\mu$ L を加え暗所で 1 時間反応させた試料を二枚貝試料 ADAM 反応液として、本法により分析した。

### カラムスイッチングによる自動前処理蛍光 HPLC 分析

自動前処理用液体クロマトグラフとして L-6200/L-6000(日立ハイテクサイエンス, 東京) グラジエントポンプを用いた。移動相は、A 液として 50 mM ギ酸, 2 mM のギ酸アンモニウムを含む超純水, B 液として 50 mM ギ酸, 2 mM のギ酸アンモニウムを含むアセトニトリル: 超純水 (95:5, v/v) の 2 相を用いた。前処理カラムとして CAPCELL PAK CN SG120(粒径 5  $\mu$ m)  $\phi$  4.6 $\times$ 250 mm(SHISEIDO, 東京)を用いた。

分析装置として液体クロマトグラフ L-7110(日立ハイテクサイエンス, 東京)アイソクラティックポンプを用い、移動相は 50 mM ギ酸, 2 mM のギ酸アンモニウムを含むアセトニトリル: 超純水 (95:5, v/v)を用いた。濃縮カラムとして Develosil C30(粒径 5  $\mu$ m)  $\phi$ 4.6 $\times$ 50 mm, 分析用カラムとして Develosil C30(粒径 5  $\mu$ m)  $\phi$ 4.6 $\times$ 150 mm(野村化学, 愛知)を用いた。蛍光検出器として F-1050(日立ハイテクサイエンス, 東京)を用い、励起波長 365 nm, 蛍光波長を 412 nm に設定し、OA 群 ADAM 誘導体を検出した。

カラムスイッチングシステムとして高圧六方バルブ (SHISEIDO, 東京) を使用した。

カラムスイッチングによる自動前処理蛍光 HPLC 分析のシステム概略図を (Fig.15) に示す。標準品および試料は 10  $\mu$ L 注入し分析した。試料の定量は標準品とのピーク面積比から AM-OA および AM-DTX1 の濃度を以下の計算式により算出した。

$$\text{定量濃度 } \mu\text{g/g} = (\text{試料 PA} / \text{標準品 PA}) \times \text{標準品濃度} \times \text{希釈係数}$$

PA はクロマトグラムのピーク面積を表し、標準品は 1  $\mu$ g/mL を用い、希釈係数は試料 1 g あたり 9 倍量の 90% メタノールによって抽出していることから、10 倍希釈となる。

#### 前処理カラムによる AM-OA および AM-DTX1 の蛍光 HPLC 分析

前処理カラム Shiseido CAPCELL PAK CN SG120  $\phi$ 4.6 $\times$ 250 mm と蛍光検出器を直結し、移動相条件として 60% B、流速 2 mL/min の分離条件でシリカカートリッジカラムによる前処理をした AM-OA・AM-DTX1 標準液を測定した。Shiseido CAPCELL PAK CN SG120  $\phi$  4.6 $\times$ 250 mm における AM-OA および AM-DTX1 の溶出時間を確認し、溶出時間から高圧六方バルブの切り替え時間を最適化した。切り替えバルブのプログラムも含む AM-OA, AM-DTX1 の LC 分析条件を (Table.7, 8) に示す。

#### 添加試料の調製

OA 群が検出限界以下のホタテガイ、マガキ、ミドリイガイの 90% メタノール抽出液に対し、0.08, 0.16, 0.8  $\mu$ g/g 相当量の OA および DTX1 を添加した。貝種ごとに産地が異なる 2 検体を対象に試験し、毒を添加した試料は加水分解および ADAM 誘導体の調製を行った。本法のバラツキを明らかにするため添加回収試験の試料調製は 3 回行い、平均回収率および相対標準偏差 (RSD%) を求めた。

#### LC/MS および LC/MS/MS 分析

液体クロマトグラフとして Agilent 1200 モデル (Agilent technology, USA)、ハイブリットトリプル四重極/リニアイオン

ラップ質量分析計として 3200 Qtrap (AB Sciex, USA)を使用した。

分離条件として、カラムは Hypersil BDS C8 (粒径 3 $\mu$ m)φ2.1×50 mm (Thermo Scientific, USA)を使用した。移動相は A 液として 50 mM ギ酸, 2 mM のギ酸アンモニウムを含む超純水, B 液として 50 mM ギ酸, 2 mM のギ酸アンモニウムを含む 95 %アセトニトリル : 超純水 (95:5, v/v) の 2 相を用いた。加水分解物の OA 群は流速 0.2 mL/min の 50% B アイソクラティック条件で分離し、AM-OA・AM-DTX1 は流速 0.2 mL/min の 70% B アイソクラティック条件で分離した。標準品および試料は 5  $\mu$ L 注入し測定した。

イオン化は ESI 法により行い、加水分解した試料中の OA 群は陰イオンモードの [M-H]<sup>-</sup>を対象とした SIM 分析により定量した。AM-OA・AM-DTX1 は陽イオンモードの [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>を対象とした SIM 分析により定量した。本研究では、先行研究も含めてこれまでの研究では実施されていなかった OA 群 ADAM 誘導体に相当するピークを対象に MS/MS スペクトルを測定した。天然で毒化したイガイ試料について、カラムスイッチングによる自動前処理蛍光 HPLC 分析により検出した AM-DTX1 のピークを分取し、Syringe infusion によってイオン源へ導入した。[AM-DTX1+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>の  $m/z$  1026 をプリカーサーイオンとし、リニアイオントラップモードの Enhanced product ion scan(EPI)によって AM-DTX1 の MS/MS スペクトルを測定し、ピークの同定を行った。

## 結果および考察

### OA 群 ADAM 誘導体のカラムスイッチング条件

ADAM 反応液からは試薬由来の様々なピークが溶出することが知られている。そのため、本研究で検討した前処理カラム Capcell Pak CN SG120 における OA 群 ADAM 誘導体 (AM-OA,AM-DTX1) のピークを同定するために、シリカカートリッジカラムによる前処理により夾雑物ピークを除去する必要がある。

既報 (Lee *et al.* 1987) に従いシリカカートリッジカラムによる前処理を行った AM-OA および AM-DTX1 標準品を Capcell Pak CN SG 120 で分析した結果、明瞭な 2 本のピークが検出され、そ



れぞれ AM-OA と AM-DTX1 のピークと同定した (Fig.16)。AM-OA の溶出時間は 5.7-6.5 分、AM-DTX1 の溶出時間は 8.9-9.7 分であった。ピークの更なる確認は後述する天然試料から検出された AM-DTX1 ピークの MS/MS スペクトルの測定により行った。

次に、Capcell Pak CN SG 120 から溶離する AM-OA および AM-DTX1 画分をスイッチングバルブにより濃縮カラム Develosil C30  $\phi$ 4.6 $\times$ 50 mm へ導入し (Fig.15)、カラムスイッチングによる自動前処理条件を決定した (Table.7, 8)。

最適化した条件により、シリカカートリッジカラムによる前処理を行っていない AM-OA・AM-DTX1 標準液 (1  $\mu$ g/mL) を測定したクロマトグラムを (Fig.17) に示す。AM-OA と AM-DTX1 のピークエリア比から、既報のシリカカートリッジカラムによる前処理により AM-DTX1 の回収率が約 40% 低下していることが明らかになった。

#### 添加回収実験

ホタテガイ抽出液に対し OA と DTX1 をそれぞれ 0.08, 0.16, 0.80  $\mu$ g/g 相当量添加した試料の AM-OA および AM-DTX1 のクロマトグラムを (Fig.18, 19) に示す。マガキおよびミドリイガイについても同様のクロマトグラムが得られた。平均回収率および相対標準偏差を (Table9, 10) に示す。添加試料の S/N 比から算出した定量限界 (LOQ, S/N=10) は AM-OA において 8.55 ng/g, AM-DTX1 において 8.64 ng/g であり、LC/MS 分析と同等の感度を得られることが明らかになった。さらに、全ての添加試料で回収率は約 90 ~ 115% となり、相対標準偏差も 10% 以下となることから本法は、CODEX 国際規格などに適合した精確な分析法であることが明らかとなった。

#### LC/MS 分析との相関

天然で毒化したイガイの自動前処理蛍光 HPLC 分析により得られた OA 群 ADAM 誘導体のクロマトグラムを (Fig20) に示す。また、同一試料から得られた OA 群の LC/MS クロマトグラム並びに OA 群 ADAM 誘導体の LC/MS クロマトグラムを (Fig 21,22) に示す。天然で毒化したイガイからは OA は検出されず、高濃度の DTX1 が検出された。毒化したイガイ 20 検体の自動前処理蛍

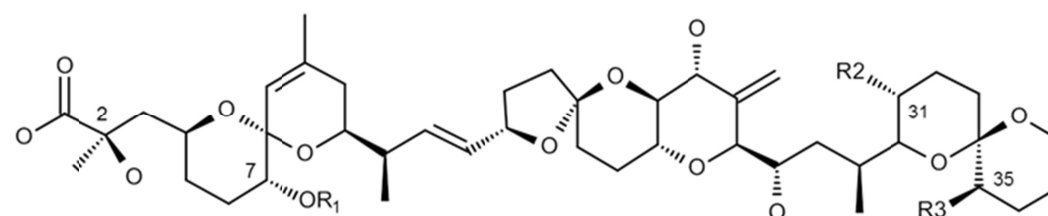
光 HPLC 分析による AM-DTX1 の定量値と LC/MS 分析による DTX1 および AM-DTX1 の定量値の相関を(Fig.23, 24)に示す。天然で毒化したイガイの自動前処理蛍光 HPLC 分析による AM-DTX1 の定量値と LC/MS 分析による DTX1 および AM-DTX1 の定量値は高い相関が得られた。また LC/MS 分析による下痢性・脂溶性貝毒の定量はマウス毒性試験との相関性が確認されており (Toshiyuki Suzuki *et al.* 2005)、同様に本法は下痢性貝毒公定法であるマウス毒性試験による OA 群の毒力値とも相関が得られると考えられる。

#### MS/MS スペクトルによる OA 群 ADAM 誘導体の同定

毒化したイガイの自動前処理蛍光 HPLC 分析で検出した AM-DTX1 のピークを分取し、Syringe infusion によって測定した MS/MS スペクトルを(Fig.25)に示した。特徴的なスペクトルとして AM-DTX1 の Anthracene 部分に由来する  $m/z$  191 およびポリエーテル構造に由来する連続した脱水ピークが観測された(Fig.26)。OA 群 ADAM 誘導体の MS/MS スペクトルは本研究により初めて測定されたものであるが、本結果からこれまで OA 群 ADAM 誘導体のピークとして同定してきたピークが正真であることが初めて確認された。

また、本結果から OA 群 ADAM 誘導体は Anthracene 構造由来の  $m/z$  191 が強く検出されるため、ピーク同定だけでなく  $m/z$  191 を対象とした precursor ion scan 分析を行うことで未知の OA 群類縁体を検索することも可能であり、高感度な類縁体検索法としても有望である。

图 表



	R1	R2	R3
okadaic acid (OA)	H	C	H
dinophysistoxin-1 (DTX1)	H	C	C
7- O-acyl-dinophysistoxin-1 (DTX3)	Acyl	C	C

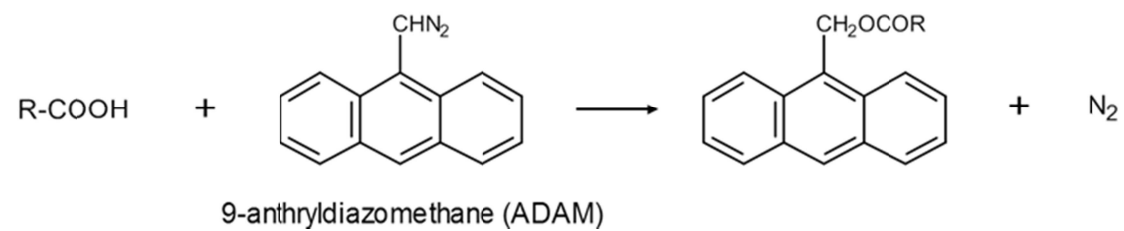


Fig.14 Chemical structure of OA analogs and derivatization of toxins with 9-Anthryldiazomethane.

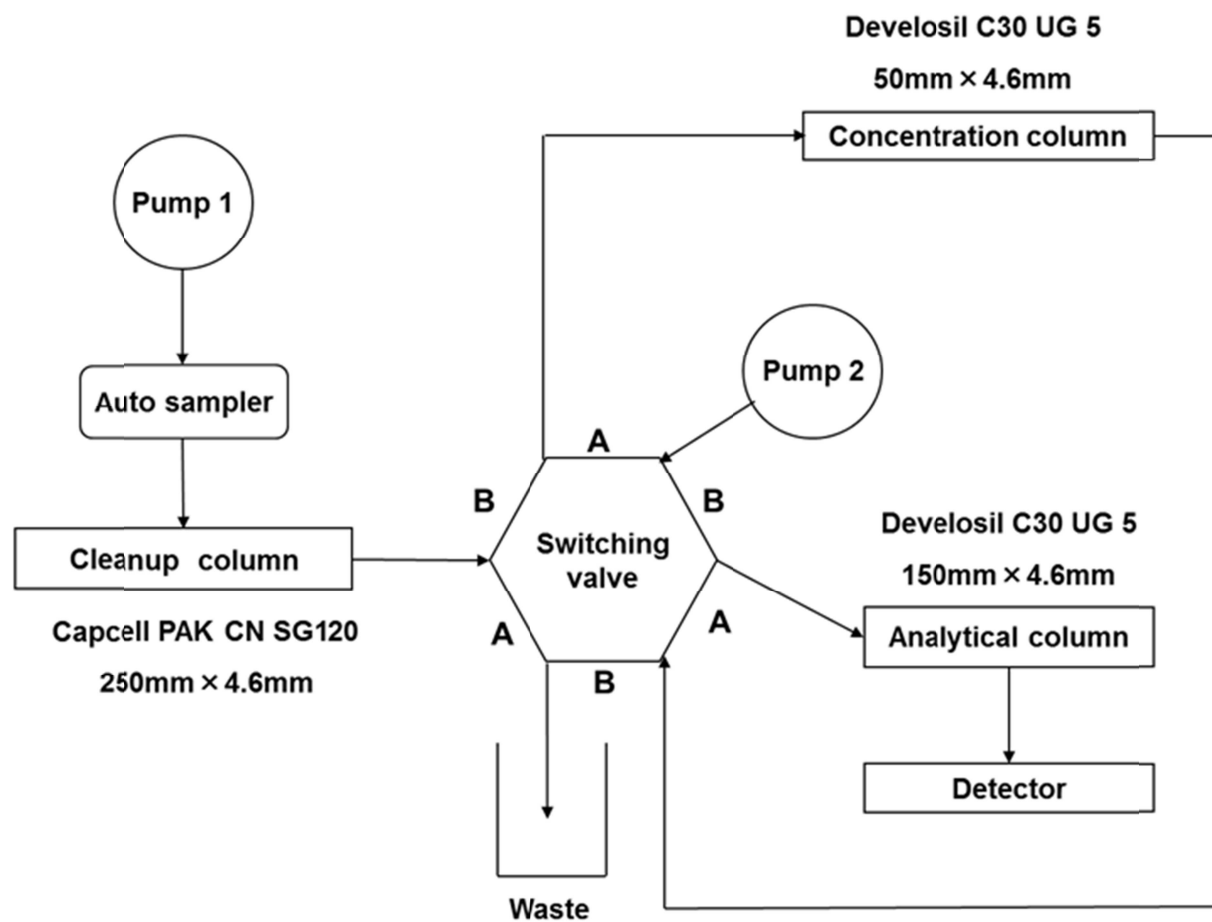


Fig.15 Schematic diagram of the HPLC-FLD system with an automatic column-switching cleanup valve.  
Pump 1, gradient pump, and Pump 2, isocratic pump.

Table.7 Gradient program for cleanup and analysis of ADAM derivative of OA

OA condition				column switching valve		
Pump 1 Cleanup						
Min	Mobile Phase (%B)	Flow rate (mL/min)	Note	Min	Valve	Note
0.0	60			5.7	B	
				6.5	A	Fractionation
6.6	60	2.0	<div> <div>↑</div> <div>↓</div> </div> Wash a cleanup column			
6.7	100					
13.0	100					
13.1	60		<div> <div>↑</div> <div>↓</div> </div> Equilibrate a cleanup column			
20.0	60					
Pump 2 Analysis						
0.0	100	1.0	Analysis			
20.0						

Table.8 Gradient program for cleanup and analysis of ADAM derivative of DTX1

DTX1 condition				column switching valve			
Pump 1 Cleanup							
Min	Mobile Phase (%B)	Flow rate (mL/min)	Note	Min	Valve	Note	
0.0	60	2.0		8.9	B	Fractionation	
				9.7	A		
9.8	60						
9.9	100		↕	Wash a cleanup column			
16.0	100		↕				
16.1	60		↕	Equilibrate a cleanup column			
25.0	60		↕				
Pump 2 Analysis							
0.0	100	1.0	Analysis				
25.0							

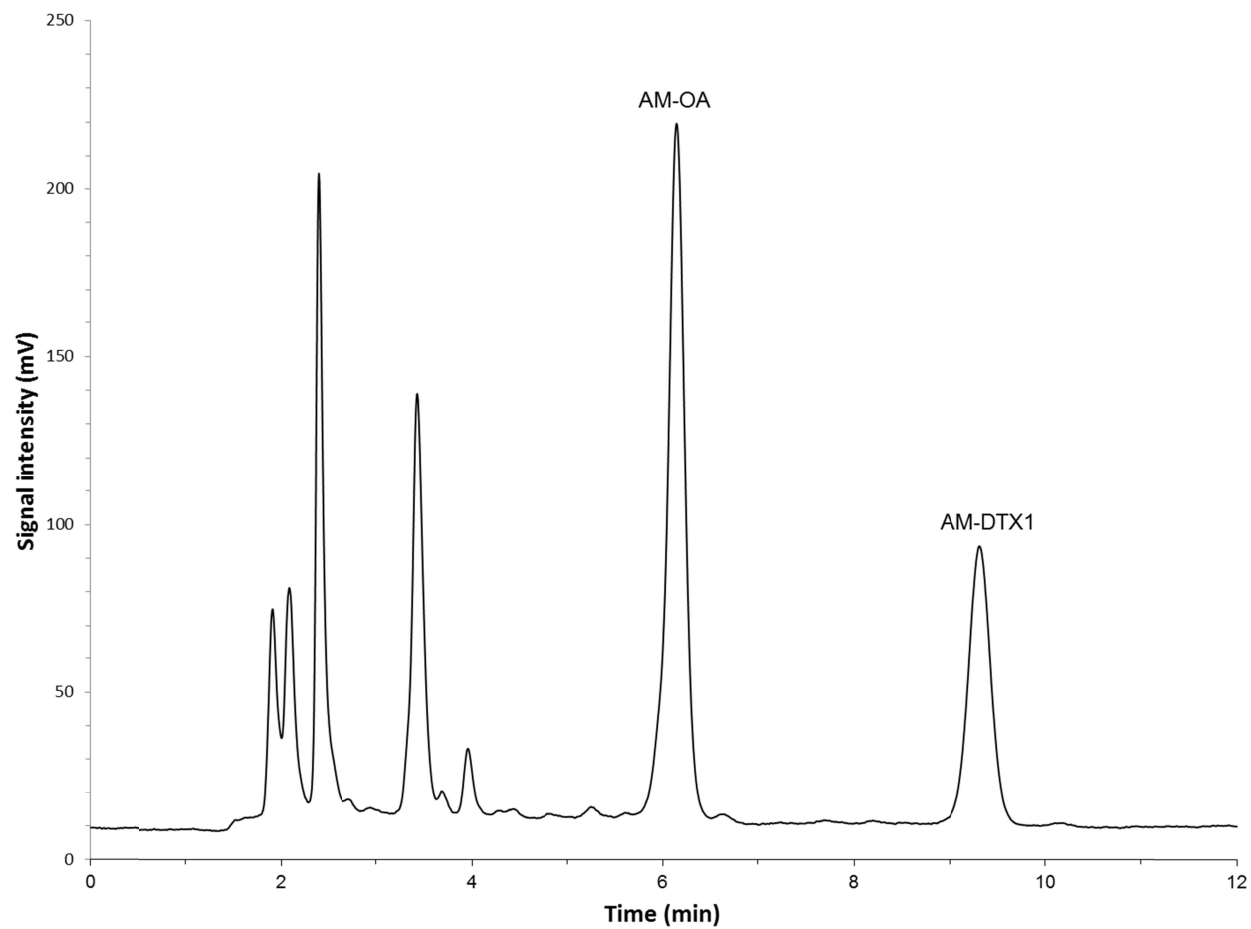


Fig.16 Chromatogram of authentic OA and DTX1 ADAM derivatives on the Capcell Pak CN SG120 column (250 × 4.6 mm). A mixture of authentic OA and DTX1 ADAM derivatives prepared with cleanup by a SepPak silica cartridge was analyzed.

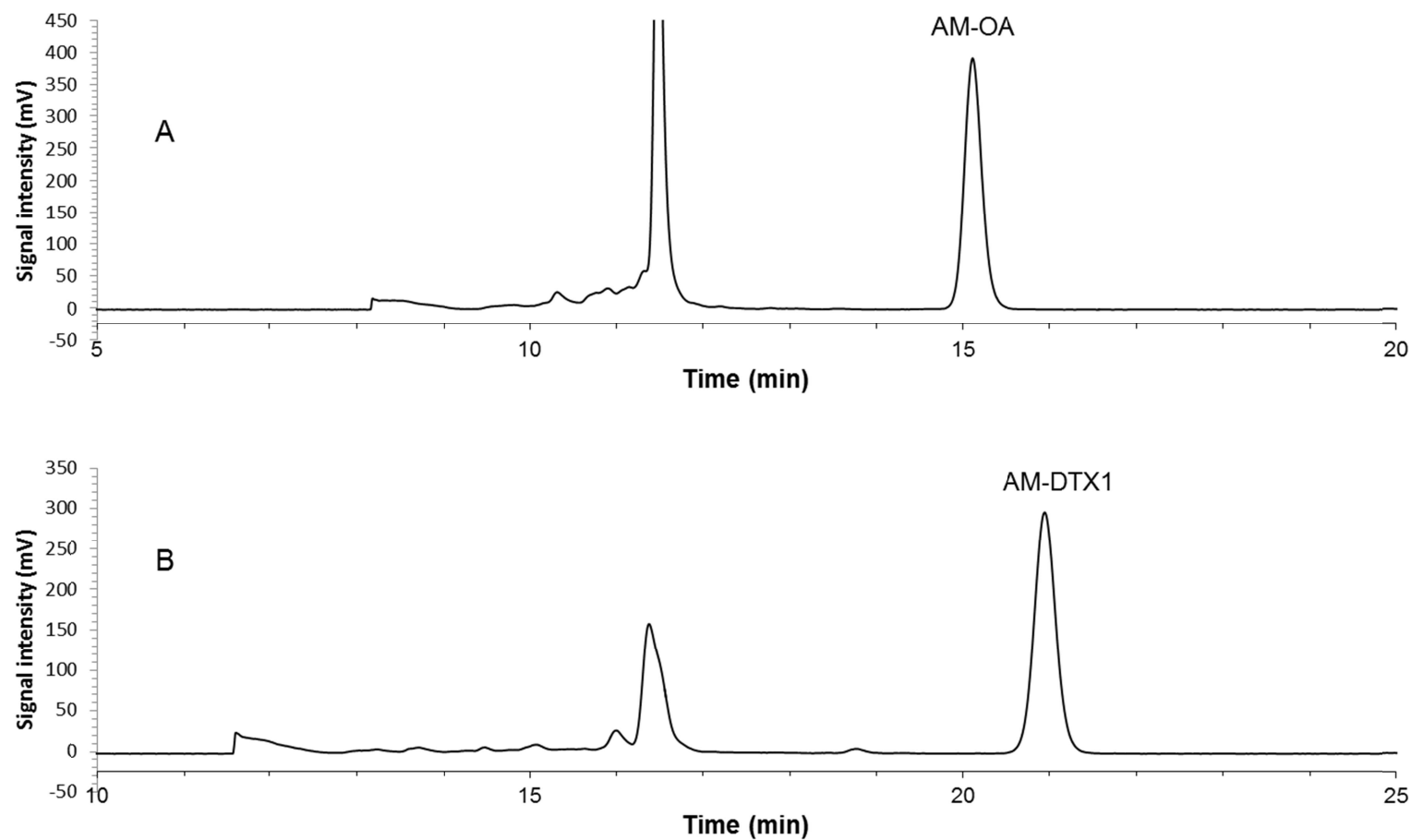


Fig.17 Chromatograms of authentic OA and DTX1 (B) ADAM derivatives from the automatic column switching cleanup HPLC-FLD. A mixture of authentic OA and DTX1 ADAM derivatives without cleanup by SepPak silica cartridge was analyzed.



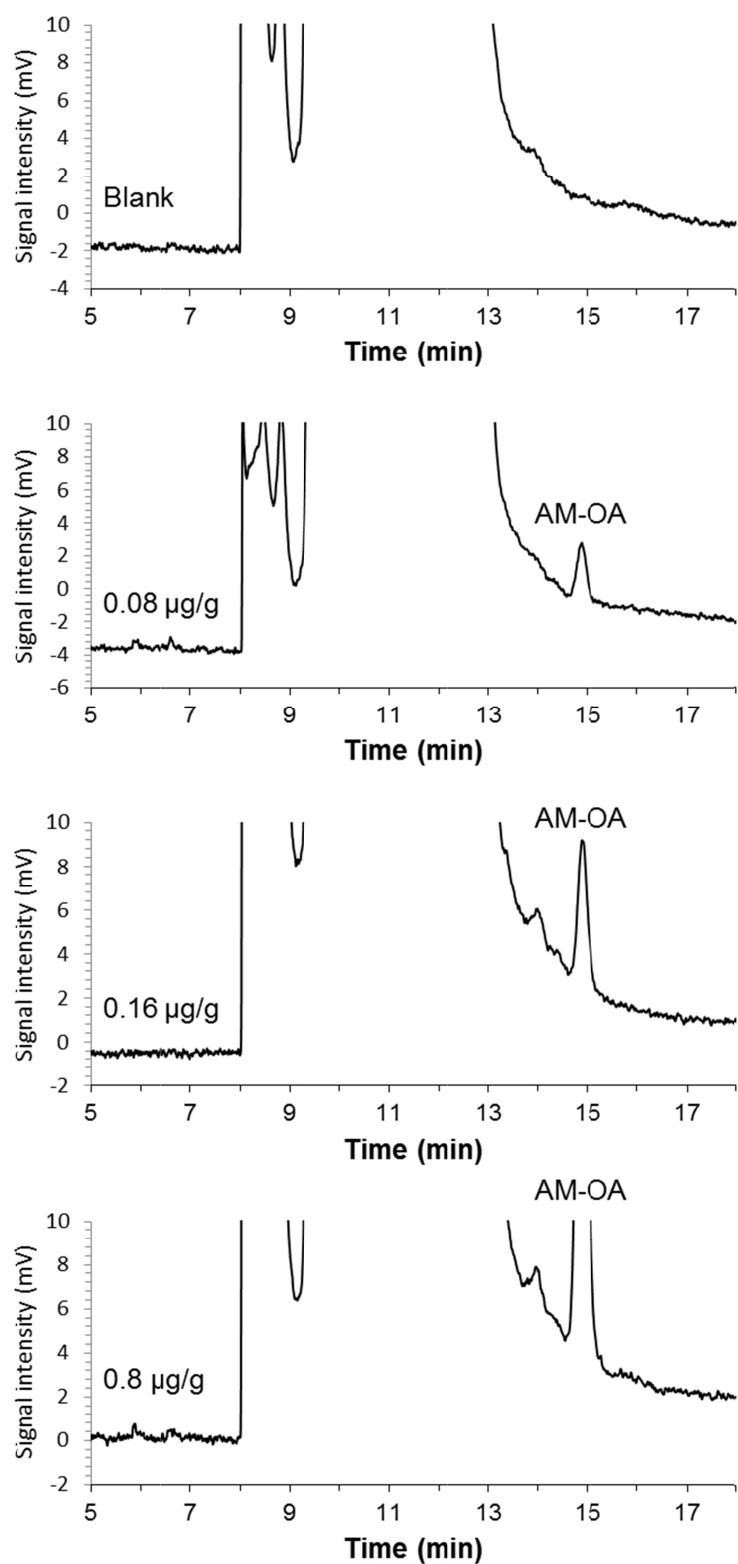


Fig.18 Chromatograms of ADAM derivatives of toxins obtained from scallops fortified with OA the range between 0.08 and 0.8  $\mu\text{g/g}$  from the automatic column-switching cleanup HPLC-FLD.

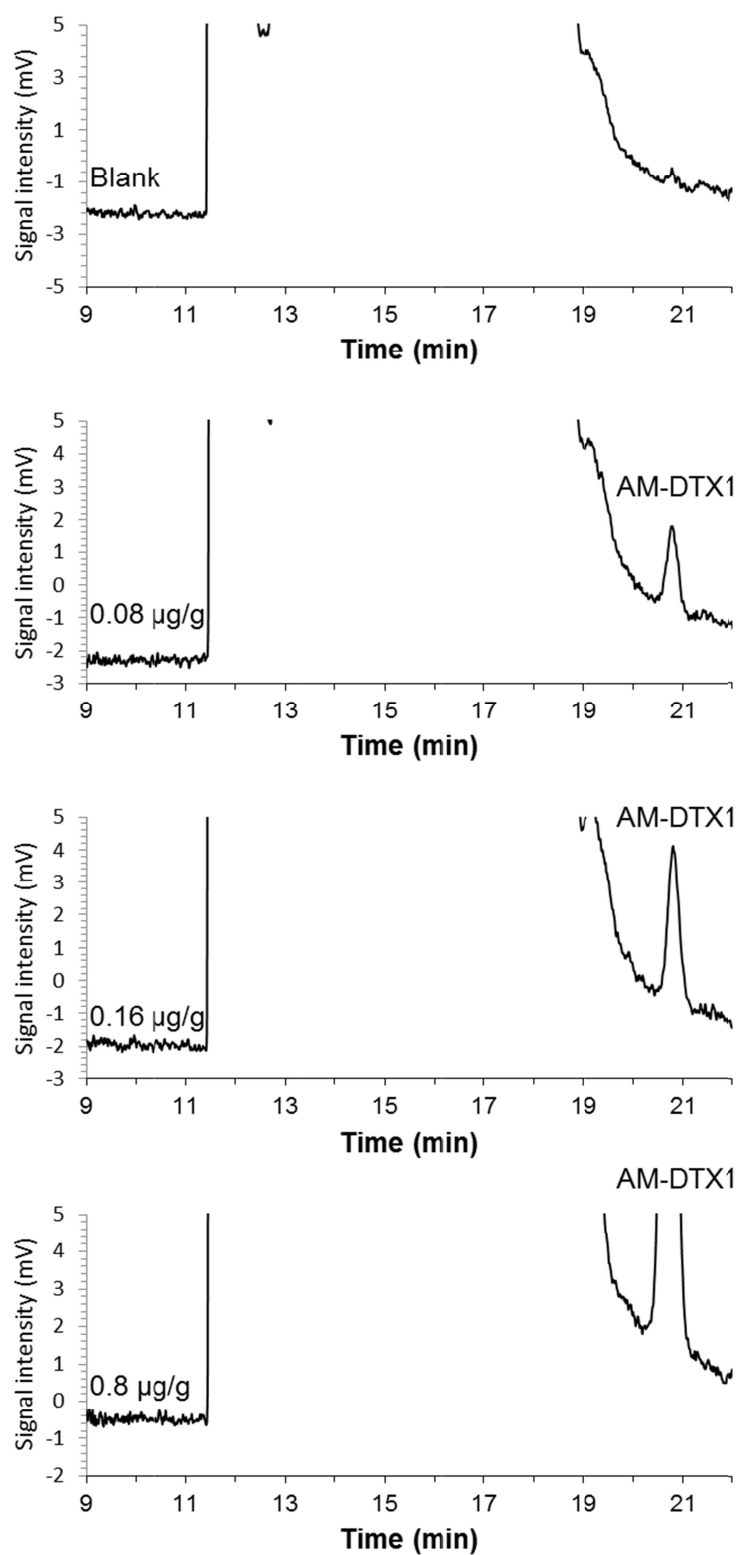


Fig.19 Chromatograms of ADAM derivatives of toxins obtained from scallops fortified with DTX1 the range between 0.08 and 0.8 µg/g from the automatic column-switching cleanup HPLC-FLD.

Table.9 Recovery of OA from methanolic extracts of bivalves.

OA recovery rate			
Sample	added toxin ( $\mu\text{g/g}$ )	Average recovery (%) (n=3)	RSD (%)
mussel no.1	0.08	93.2	4.7
mussel no.2		95.2	8.8
oyster no.1		104.9	1.7
oyster no.2		96.0	3.8
scallop no.1		93.8	3.4
scallop no.2		101.2	3.7
mussel no.1	0.16	100.5	8.4
mussel no.2		98.6	1.4
oyster no.1		108.3	4.4
oyster no.2		95.4	5.9
scallop no.1		95.6	4.3
scallop no.2		96.7	6.3
mussel no.1	0.80	100.9	4.2
mussel no.2		112.4	0.9
oyster no.1		101.2	1.0
oyster no.2		105.7	7.2
scallop no.1		90.0	4.2
scallop no.2		110.1	1.9

Table.10 Recovery of DTX1 from methanolic extracts of bivalves.

DTX1 recovery rate			
Sample	added toxin ( $\mu\text{g/g}$ )	Average recovery (%) (n=3)	RSD (%)
mussel no.1	0.08	96.1	4.2
mussel no.2		100.4	2.1
oyster no.1		97.8	3.1
oyster no.2		96.1	4.2
scallop no.1		97.0	2.3
scallop no.2		98.6	7.2
mussel no.1	0.16	96.9	6.8
mussel no.2		96.9	6.9
oyster no.1		109.4	1.6
oyster no.2		97.4	9.9
scallop no.1		95.0	3.7
scallop no.2		95.4	3.0
mussel no.1	0.80	95.5	2.6
mussel no.2		97.8	1.2
oyster no.1		97.8	4.2
oyster no.2		113.0	5.2
scallop no.1		97.8	3.1
scallop no.2		111.4	4.1

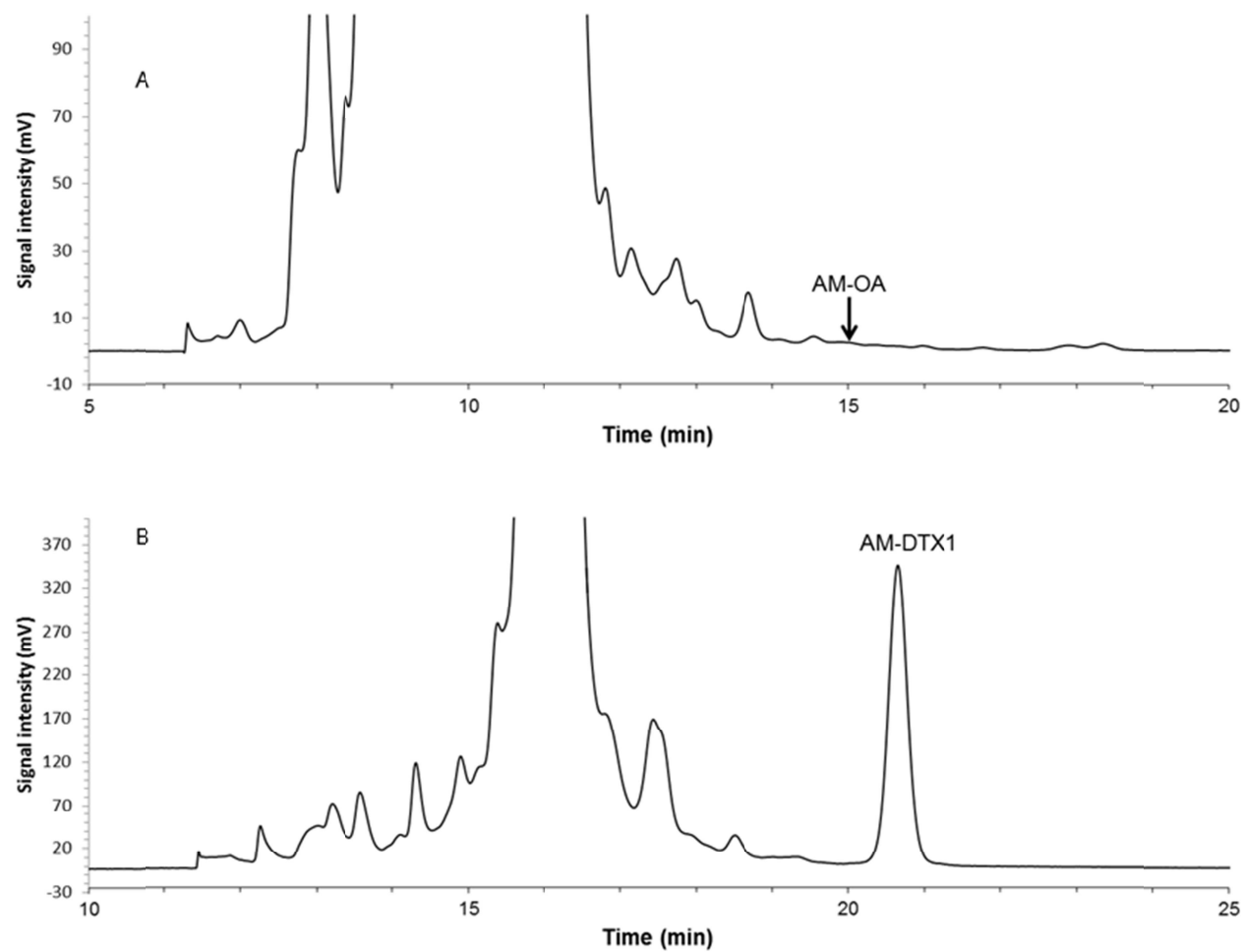


Fig.20 Chromatograms of OA (A) and DTX1 (B) ADAM derivatives detected in naturally contaminated mussels collected in Japan from the automatic column-switching cleanup HPLC-FLD.

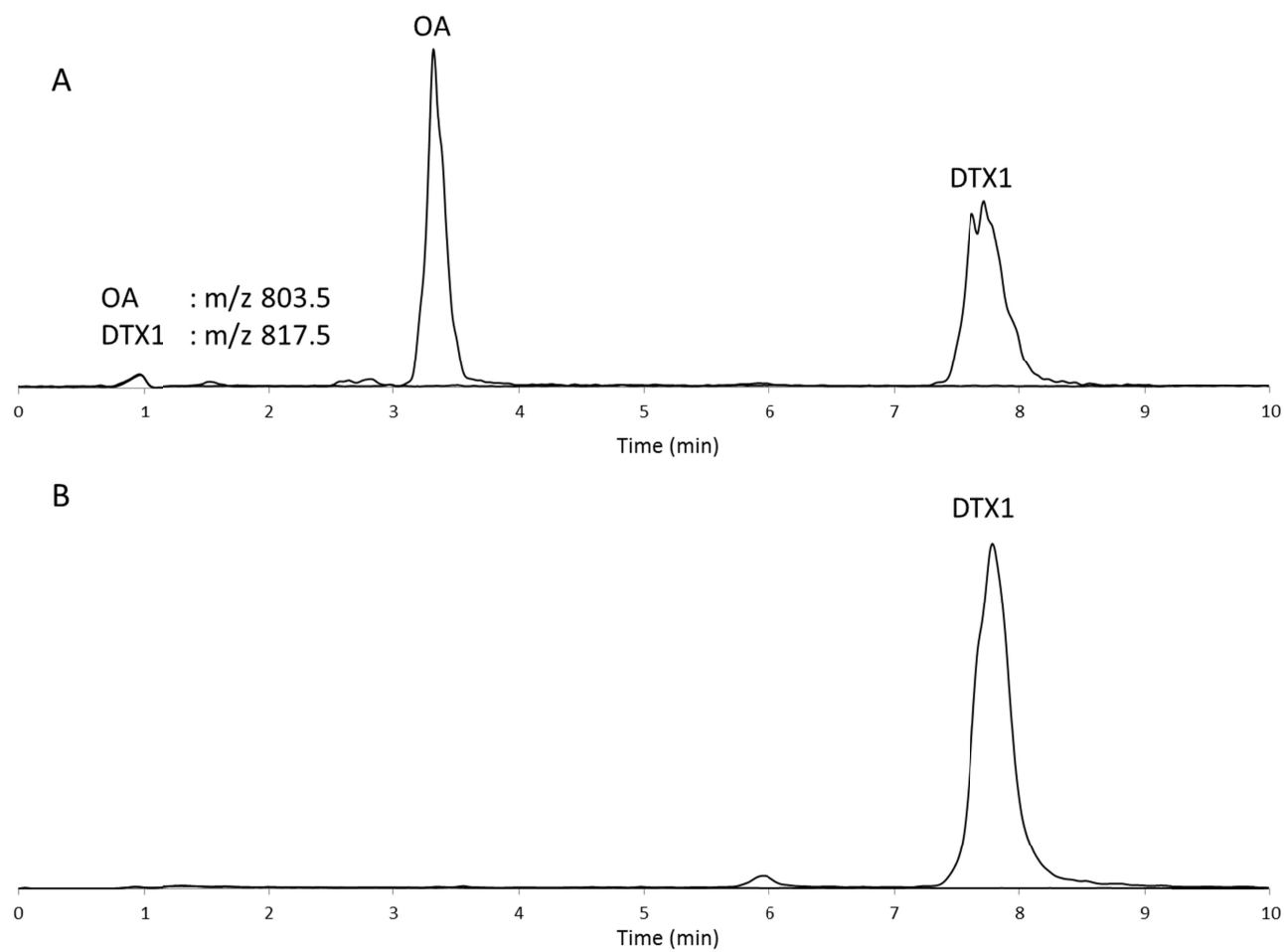


Fig.21 HPLC/SIM-MS chromatograms of OA and DTX1 obtained from (A) standard toxins and (B) naturally contaminated mussels traced for  $[M-H]^-$  ion on the Hypersil-BDS-C8 column ( $50 \times 2.1$  mm).

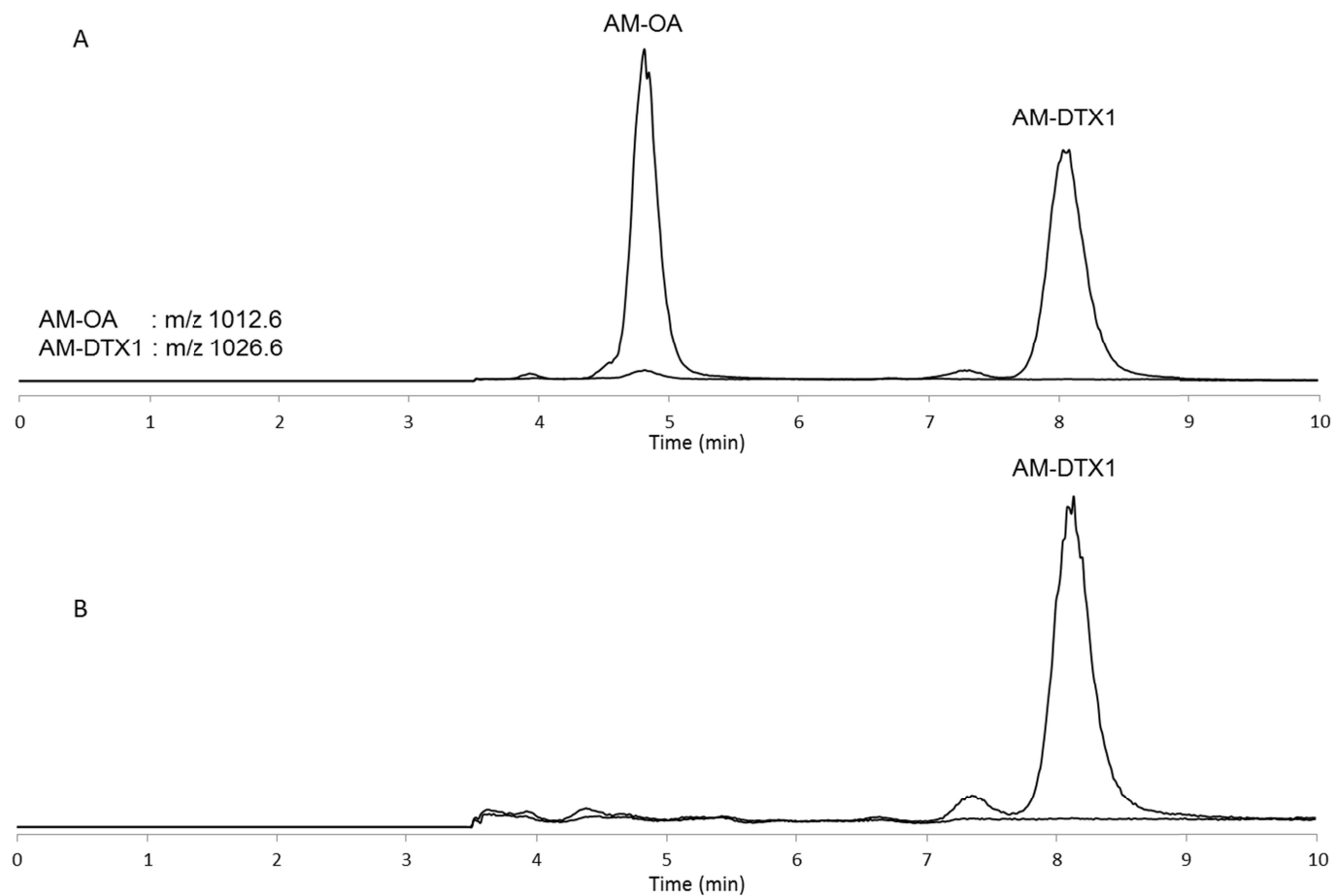


Fig.22 HPLC/SIM-MS chromatograms of OA and DTX1 ADAM derivatives obtained from (A) standard toxins and (B) naturally contaminated mussels traced for  $[M+NH_4]^+$  ion on the Hypersil-BDS-C8 column ( $50 \times 2.1$  mm).

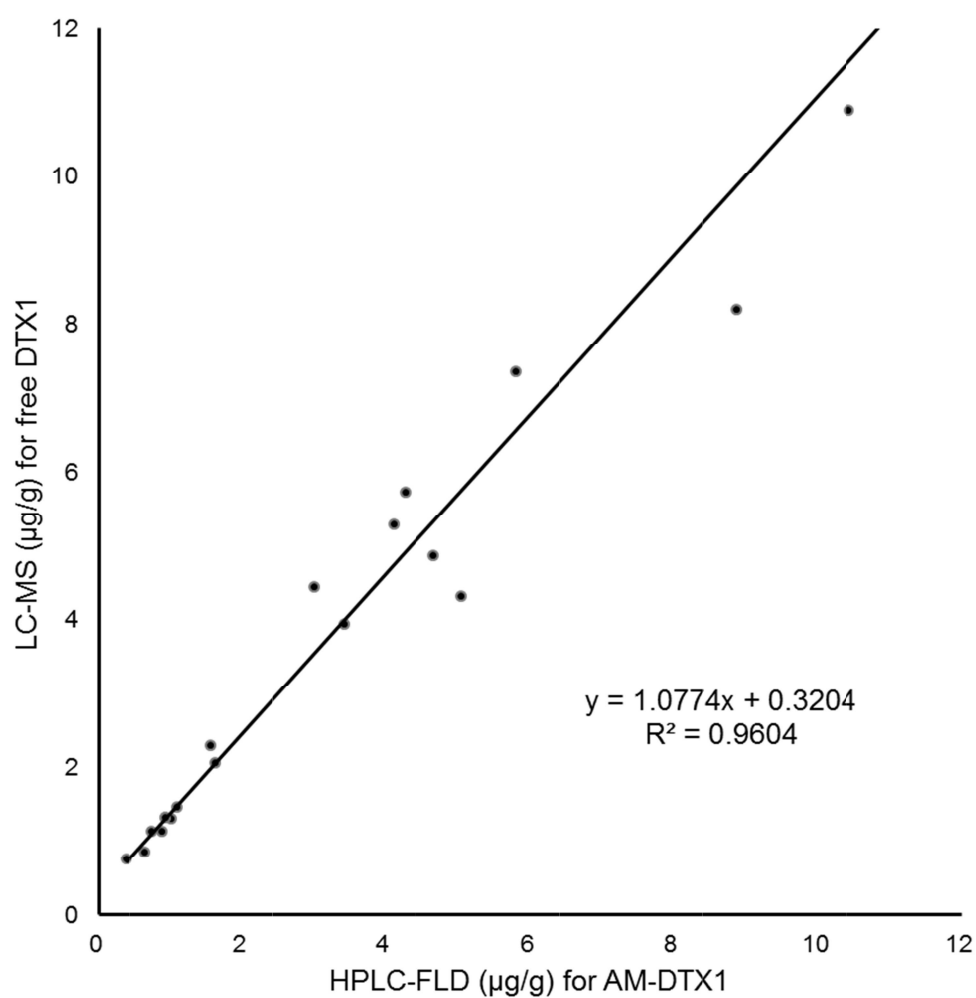


Fig.23 Correlation of DTX1 contents in 20 naturally contaminated mussels quantitated between HPLC-FLD for ADAM derivative and HPLC/SIM-MS for free toxin.

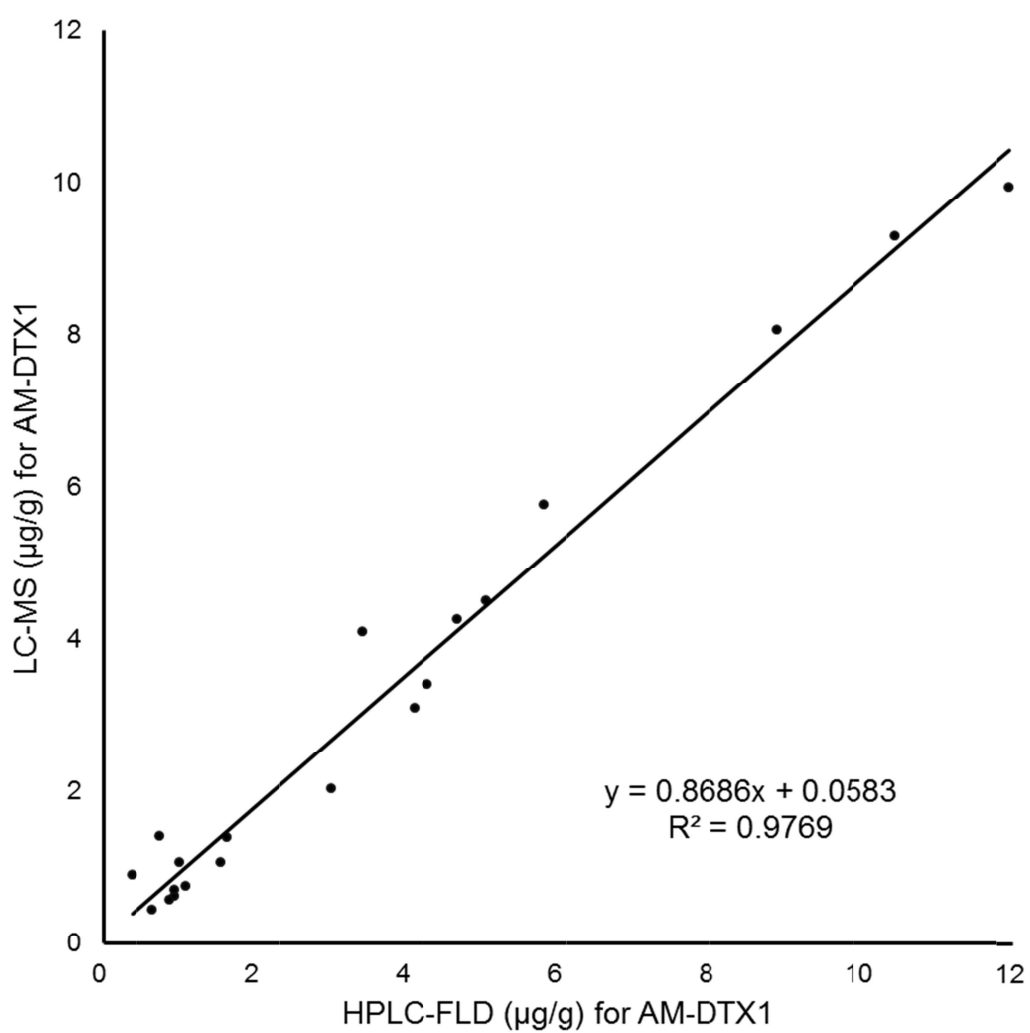


Fig.24 Correlation of DTX1 contents in 20 naturally contaminated mussels quantitated between HPLC-FLD and HPLC/SIM-MS for the ADAM derivative.



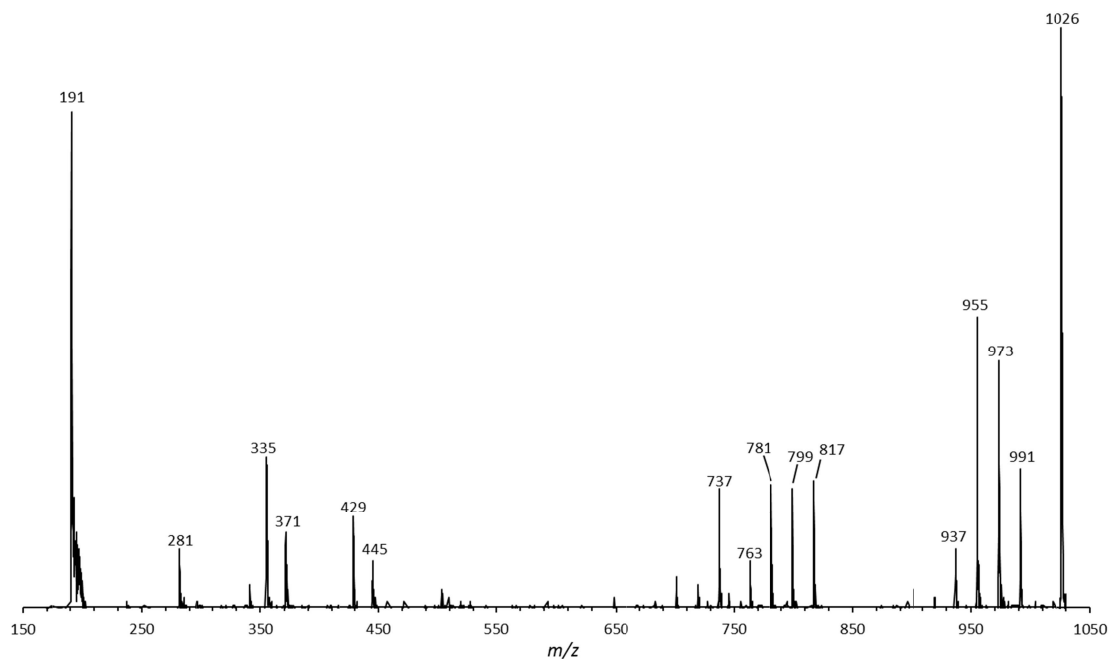


Fig.25 Full scan linear ion trap MS/MS spectrum obtained for  $[M+NH_4]^+$  of DTX1 ADAM derivative from naturally contaminated mussel.

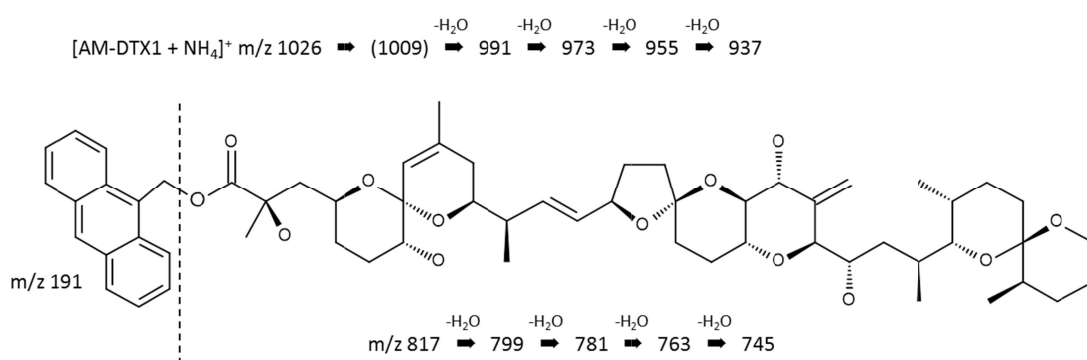


Fig.26 Proposed MS/MS diagram of DTX1 ADAM derivative from naturally contaminated mussel.

### 第 3 章

#### 国内沿岸で採取した珪藻 *Pseudo-nitzschia* 属の LC/MS/MS 分析による記憶喪失性貝毒ドウモイ酸生産能の解析

第 1 章、第 2 章を通して、LC/MS などの機器分析法は有毒成分の検出において極めて強力な道具であることを示してきた。本章は同様に機器分析法の一つである LC/MS/MS 法を利用した貝毒分析について述べる。記憶喪失性貝毒の原因毒であるドウモイ酸(DA)は珪藻の *Pseudo-nitzschia* 属などが生産している。本研究では本邦沿岸域で採集した *Pseudo-nitzschia* 属の出現種を解析し、LC/MS/MS 分析によって単離培養した *Pseudo-nitzschia* 属の DA 生産能を調査した。*Pseudo-nitzschia* 属の培養液を直接分析するとともに、培地中に低濃度に含まれる DA を検出するため、海水中に DA を添加し、逆相分配固相抽出カラムによる濃縮法を検討した。

#### 試料および方法

##### 試薬

メタノールおよびアセトニトリルは高速液体クロマトグラフィー用を用いた(和光純薬工業, 大阪)。98%ギ酸およびギ酸アンモニウム(ナカライテスク, 京都)は精密分析用を用いた。超純水は、EASY Pure® RODI System(Barnstead, USA)により製造した。

##### DA 標準品

DA 標準液 103.8  $\mu\text{g/mL}$  (National Research Council Canada NRC CRM-DA-f)を超純水：アセトニトリル(19:1, v/v)で 1000 倍に希釈し、定量用 DA 標準品とした。QTOFMS によるフラグメントイオン解析用の DA 標準品は DA 標準液 103.8  $\mu\text{g/mL}$  を超純水：アセトニトリル(19:1, v/v)で 200 倍に希釈し、50 mM ギ酸, 2 mM ギ酸アンモニウムを加え使用した。

##### トリプル四重極 LC/MS/MS 分析

液体クロマトグラフとして Agilent 1200 モデル(Agilent technology, USA)、ハイブリットトリプル四重極/リニアイオントラ

ップ質量分析計として 3200 Qtrap (AB Sciex, USA)を使用した。

分離条件として、カラムは Hypersil BDS C8 (粒径 3 $\mu$ m)φ2.1×50 mm (Thermo Scientific, USA)を使用した。移動相は A 液として 50 mM ギ酸, 2 mM のギ酸アンモニウムを含む超純水、B 液として 50 mM ギ酸, 2 mM のギ酸アンモニウムを含むアセトニトリル: 超純水 (95:5, v/v) の 2 相を用いたグラジエント分析によって分離した。カラム温度は 20 度に保ち、グラジエント条件は 10 分間で 5% B から 100% B にし、10 分間 100% B を流速 0.2 mL/min で行った。カラムの平衡化は 5% B で 10 分間行った。

質量分析のイオン化はエレクトロスプレーイオン化法(ESI)の陽イオンモードで行い、イオン源条件としてキャピラリー電圧 4500V; イオン源温度 600°C; declustering potential(DP) 56 V で測定した。定量は Multiple Reaction Monitoring (MRM)分析により、DA の  $[M+H]^+$   $m/z$  312.2 をプリカーサーイオンとし Q1 で選択し、Q2 における窒素ガスとの衝突誘起解離により生じたプロダクトイオン  $m/z$  266 を Q3 で選択し検出した。さらに、DA の定性分析としてリニアイオントラップモードの Enhanced Product Ion Scan(EPI)による MS/MS 分析により、collision energy(CE) 25-70 V で生じるプロダクトイオンを測定した。

### QTOFMS 分析

質量分析装置として micrOTOF-Q II (Bruker Daltonics, Germany)を使用した。QTOFMSによる MS/MS 条件は ESIによりイオン化し、陽イオンモードで測定した。測定条件としてキャピラリー電圧 4500V; ドライヒーター 180°C; ドライガス 4 L/min; ネブライザーガス 0.4 bar; collision RF 値 100 Vpp; CE 20-40 V; スキャンレンジ  $m/z$  21~600 で測定した。DA 標準品はシリンジポンプにより流速 3  $\mu$ L/min で送液し、イオン源へ導入した。DA の  $[M+H]^+$  の  $m/z$  312 をプリカーサーイオンとし、DA の高分解能 MS/MS スペクトルを測定した。

### *Pseudo-nitzschia* 属の培養および同定

北海道網走市地先(ABA)および広島県広島湾(HIR)から単離された *Pseudo-nitzschia* 属は 50mL の三角フラスコに 30mL の f/2 改変培地 (Satoshi Nagai *et al.*, 2004) を加え、温度 18°C、光強度 100  $\mu$ mol

$\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、明暗周期 12hL : 12hD の光条件下で 3 週間培養した。細胞密度は顕微鏡下で計数した。

種同定については、海水 2L を  $57\mu\text{m}$  のナイロンメッシュで大型の動物プランクトンを除去した。その後、 $3\mu\text{m}$  のヌクレポアフィルターで全てのプランクトンを捕集し、DNA 抽出するまで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。次に、フィルターに 10% Chelex buffer を添加し、ホモジナイズ後、 $97^{\circ}\text{C}$  で 20 分間加熱し、DNA 抽出を行った。PCR は、AmplitaqGold を使用し、*Pseudo-nitzschia* 属を特異的に増幅するユニバーサルプライマー (Sarah M. McDonald *et al.* 2007) を用いて PCR 増幅し、クローニングを行った。1 試料当たり 32 シーケンス行い、配列を決定した。BLAST 検索により *Pseudo-nitzschia* 属の種を同定した。

#### LC/MS/MS 分析試料調製

*Pseudo-nitzschia* 属の培養液を冷解凍および超音波破碎し、細胞を破碎した。2000 g で 5 分間遠心分離を行い、上清を直接 LC/MS/MS 分析した。試料は MRM 分析において  $5 \mu\text{L}$  を装置に注入し、EPI 分析においては  $20 \mu\text{L}$  を注入し、測定した。

#### 固相抽出カラムによる DA の濃縮

濾過海水 10 mL に対し DA を 20.8 ng 相当量を添加し、添加試料海水に 1M ギ酸・40 mM ギ酸アンモニウム水溶液を  $525 \mu\text{L}$  加えた。固相抽出カラムとして Sep pak C18 plus (Waters, USA) を用いた。メタノール 10 mL、水 10 mL、50 mM ギ酸・2 mM ギ酸アンモニウム水溶液 5 mL により平衡化した固相抽出カラムに添加試料海水を供した。50 mM ギ酸・2 mM ギ酸アンモニウム水溶液 10 mL により固相抽出カラムを洗浄した。この操作により、LC/MS 検出器の汚染の原因となる海水や培養液中の不揮発性の塩などが除かれる。その後、メタノール 10 mL より DA を溶離した。メタノール画分をロータリーエバポレーターにより溶媒を除去した。水：アセトニトリル (95 : 5, v/v) 2 mL に溶解した試料を LC/MS/MS により分析した。添加回収試験は 3 回行い、結果より平均回収率および相対標準偏差を算出した。さらに *Pseudo-nitzschia* 属 (091016HIR07、0906HIR06、0907ABA03、0907ABA06、0907ABA08、091030HIR11) 培養液について同操作により濃縮した。

## 結果および考察

### 添加回収実験

標準品および濾過海水添加試料における固相抽出カラムへの非分配画分、洗浄画分、メタノール溶出画分の MRM クロマトグラムを (Fig.27) に示す。DA は保持時間 7.6 分にピークが検出され、本装置における DA の検出限界 (S/N 比 : 3) は 0.2 ng/mL、定量限界 (S/N 比 : 10) は 0.6 ng/mL であった。

メタノール溶出区の平均回収率は 104.7%、相対標準偏差は 3.5% となり、固相抽出カラム非分配区および洗浄区について DA は検出限界以下であることから、固相抽出カラムに DA は完全に保持されたと考えられた。同手法により *P. multistriata* (091016HIR07) 培養液についても同様の濃縮効率が得られた (Fig.28)。本法により、培養液中の DA を効率的に濃縮できることが証明された。さらに本法はプランクトンネットにより採集、凍結保存した海水濃縮物中の DA を回収する際にも有効な手法と考えられる。

DA は 3 つのカルボキシ基を有し、イオン性水溶性化合物であることから逆相分配固相抽出カラムによる保持は難しく、またイオン交換樹脂を用いた濃縮は海水や培地中に含まれる塩の影響から困難であった。DA は酸性条件下でカルボキシル基の解離が抑制されるため、Sep pak C18 plus に強く保持されると考えられる。二枚貝試料の DA を分析するために逆相分配固相抽出カラムを用いた前処理法の報告例はあるが、藻類培養液の DA を濃縮するために逆相分配固相抽出カラムを用いた例は極めて少ない。(Zhihong Wang *et al*, 2007)。本研究で検討した固相抽出カラムによる DA の濃縮法は、簡易的に海水や培地中の DA を高い精度で濃縮・測定することが可能であり、培地や現場海水の分析に有効である。

### *Pseudo-nitzschia* 属の DA 生産能

DA 標準液、*P. multiseri* (091016HIR06) 培養液、固相抽出により 5 倍濃縮処理をした *P. pungens* (091030HIR11) 培養液の MRM クロマトグラムを (Fig.29) に示す。*P. multiseri* (091016HIR06) 培養液から DA が検出された。本研究で検討した LC/MS/MS 法は DA を極めて高感度に検出することが可能である。そのため、*P. multiseri* (091016HIR06) 培養液においては、培養液を直接 LC/MS/MS に注入

することにより、明瞭な DA のピークが検出された。一方、固相抽出により 5 倍濃縮処理をした *P. pungens* (091030HIR11) 培養液からは DA のピークは検出されなかった。この培養株の細胞あたりの毒量は LC/MS/MS 法の検出限界値から 0.009 pg/cell 以下と推定された。この値は原液の直接分析により得られた値であり、固相抽出法による濃縮を行った試料において推定される毒量は 0.0002 pg/cell 以下となる。これまでに報告されている *P. pungens* の有毒株における DA 生産能は 0.47 pg/cell であり (Lesley Rhodes *et al.*, 1996)、本邦の *P. pungens* の DA 生産能は極めて低いと言える。これまでの知見の多くは LC-UV 検出や LC-DAD 検出により検証された事例が多く、本属の毒生産能の下限値も 0.1 pg/cell 程度であった。本研究の LC/MS/MS 法と固相抽出法により、DA 生産能が 0.04 pg/cell の *Pseudo-nitzschia* 属をわずか 1000 細胞で検出可能であり、*Pseudo-nitzschia* 属の DA 生産能の下限値を探索する上でも意義は極めて大きいと考える。

本研究で測定した *Pseudo-nitzschia* 属の培養液の定量結果を (Table.11) に示す。DA が検出されなかった株の推定される最低毒量は、LC/MS/MS による培養液の直接分析により得られた値であるが、この中で培養株 0906HIR06、0907ABA03、0907ABA06、0907ABA08、091030HIR11 の 5 株については固相抽出法により、さらに 1/5 の最低毒量であることを確認し、これらの値は既報で報告されている無毒株より推定される毒量の約 1/80 以下である (Aurelie Lelong *et al.* 2012)。

本研究により、広島県の *P. multiseriata*, *P. multistriata* の DA の生産を確認した。*P. multistriata* の DA 生産能についてイタリアのナポリ湾で採集された *P. multistriata* より報告されている (Luisa Orsini *et al.* 2002)。しかし、ニュージーランドおよびオホーツク海で採集された *P. multistriata* から DA は検出していない (Lesley L. Rhodes *et al.* 2000, Tatiana Yu. Orlova *et al.* 2008)。本研究において、広島湾で採集した *P. multistriata* から DA を検出し、本邦の *P. multistriata* において初めて DA の生産能を明らかにした。

培養した *P. multiseriata*, *P. multistriata* の DA 生産量は 0.57 ~ 1.20 pg/cell と微量であったが、わが国において DA により二枚貝が毒化するリスクはあると考えられる。なお、これらの培養株から検出された DA は次節で示すとおり、LC/MS/MS フラグメントイオンを測定することにより、確実な DA の同定を行った。

### DA の MS/MS フラグメントイオンの帰属

標準品および MRM 分析により DA を検出した *Pseudo-nitzschia* 属培養株(091016HIR06, 091016HIR07)についてトリプル四重極で得られた MS/MS スペクトルを(Fig.30)に示す。分子イオンピーク  $m/z$  312、基準ピーク  $m/z$  266に加えて様々なフラグメントイオンが得られた。*Pseudo-nitzschia* 属培養株の MS/MS スペクトルは DA 標準品の MS/MS スペクトルと一致し、DA と同定した。

また、QTOFMS で得られた DA 標準品の MS/MS スペクトルを(Fig.31)に示す。トリプル四重極 LC/MS/MS スペクトルと類似したフラグメントイオンが得られているが、より多くのフラグメントイオンが得られた。DA の LC/MS/MS フラグメンテーションの帰属ダイアグラムを(Fig.32)に示す。DA の陽イオンモードにおけるフラグメンテーションは、脱カルボキシル基反応と脱水反応が主な反応であるが、 $m/z$  119 のように共役化により化学的に安定なフラグメントイオンも検出されており、フラグメンテーション規則における例外的なイオンは観測されなかった。

既報で報告されているイオントラップ LC/MS/MS で得られる  $m/z$  175~266 のフラグメントイオンの帰属について(A. Furey *et al*, 2001)、QTOFMS による MS/MS 分析で得られた精密質量実測値と理論値の比較により検証した結果、測定誤差である 5  $mamu$  の範囲で一致したため、既報で報告されたイオンの帰属の妥当性が確認された。さらに、帰属されていないイオンについても新たに DA の構造に帰属させた。(Fig.32)で示すフラグメンテーションダイアグラムは、これまでに報告された DA の MS/MS スペクトル帰属例の中では最も詳細であり、DA 類縁体の化学構造の解析や同定に極めて有用である。

图表

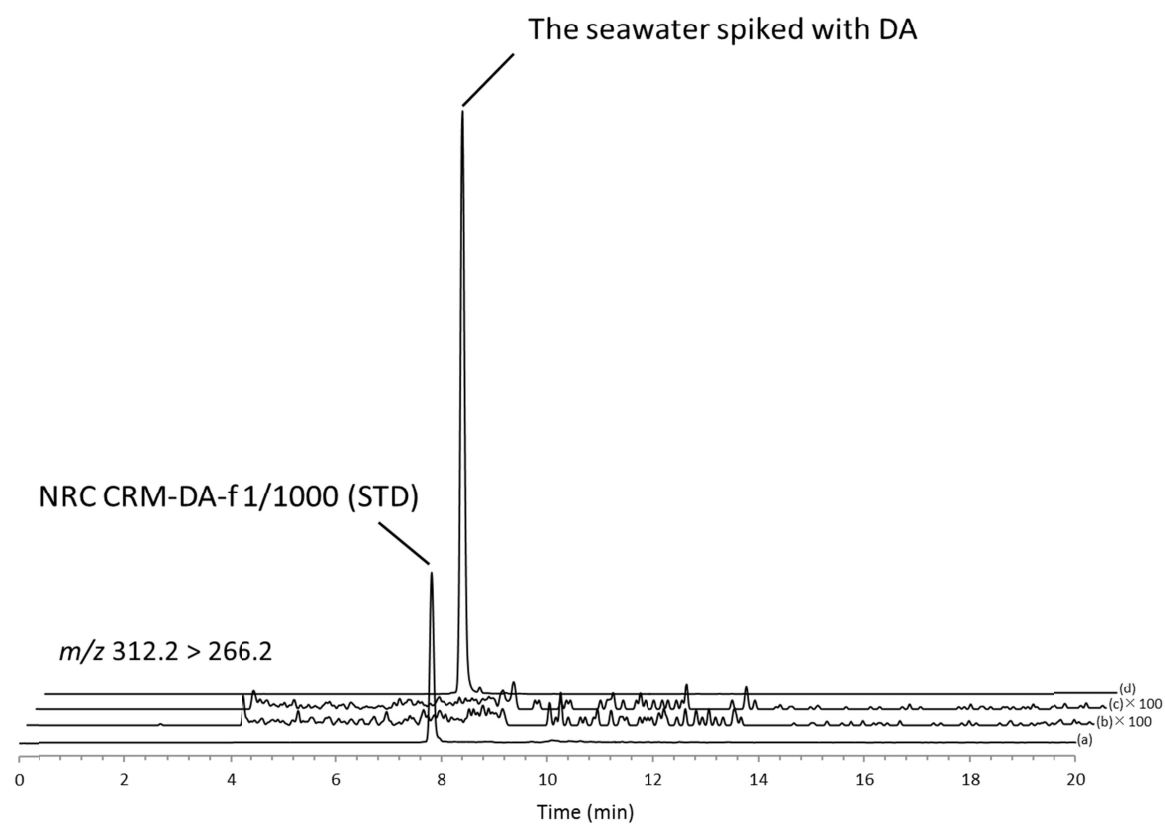


Fig.27 MRM LC/MS/MS Chromatograms of domoic acid obtained for (A) DA Standard; (B) Seawater passed through SPE; (C) DW eluate from SPE; (D) DA eluted with MeOH.



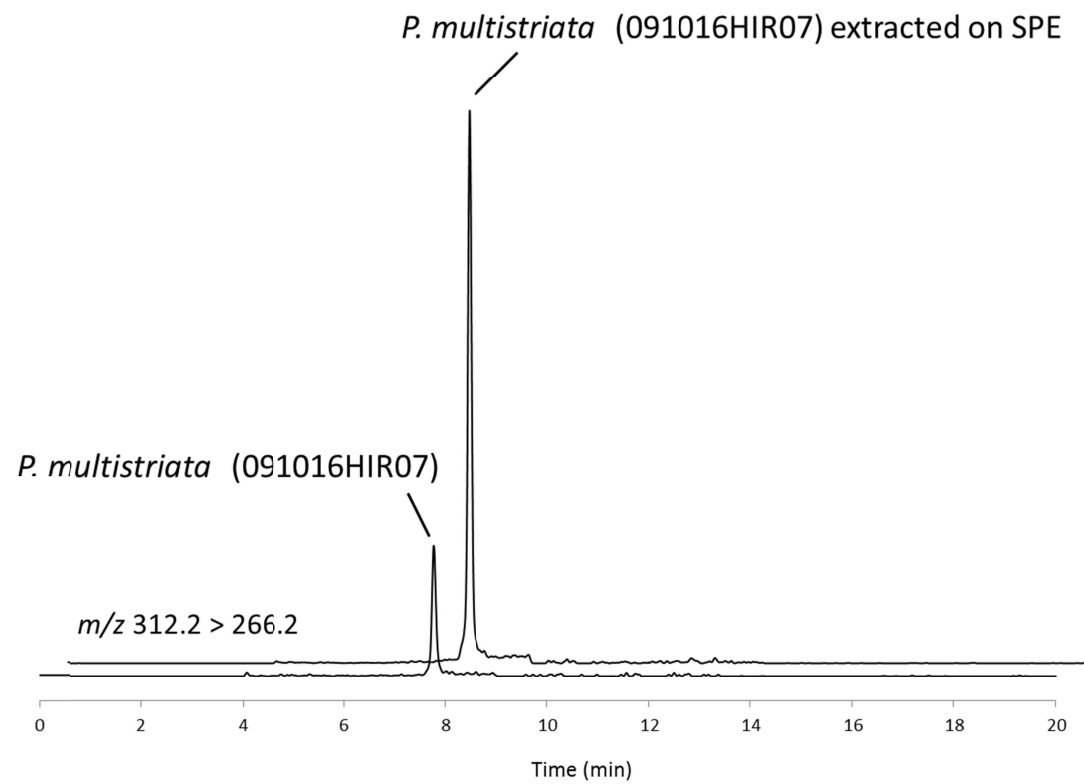


Fig.28 MRM LC/MS/MS Chromatograms of domoic acid obtained from cultured *Pseudo-nitzschia multistriata*. (A) direct injection of culture medium; (B) SPE extract concentrated five times

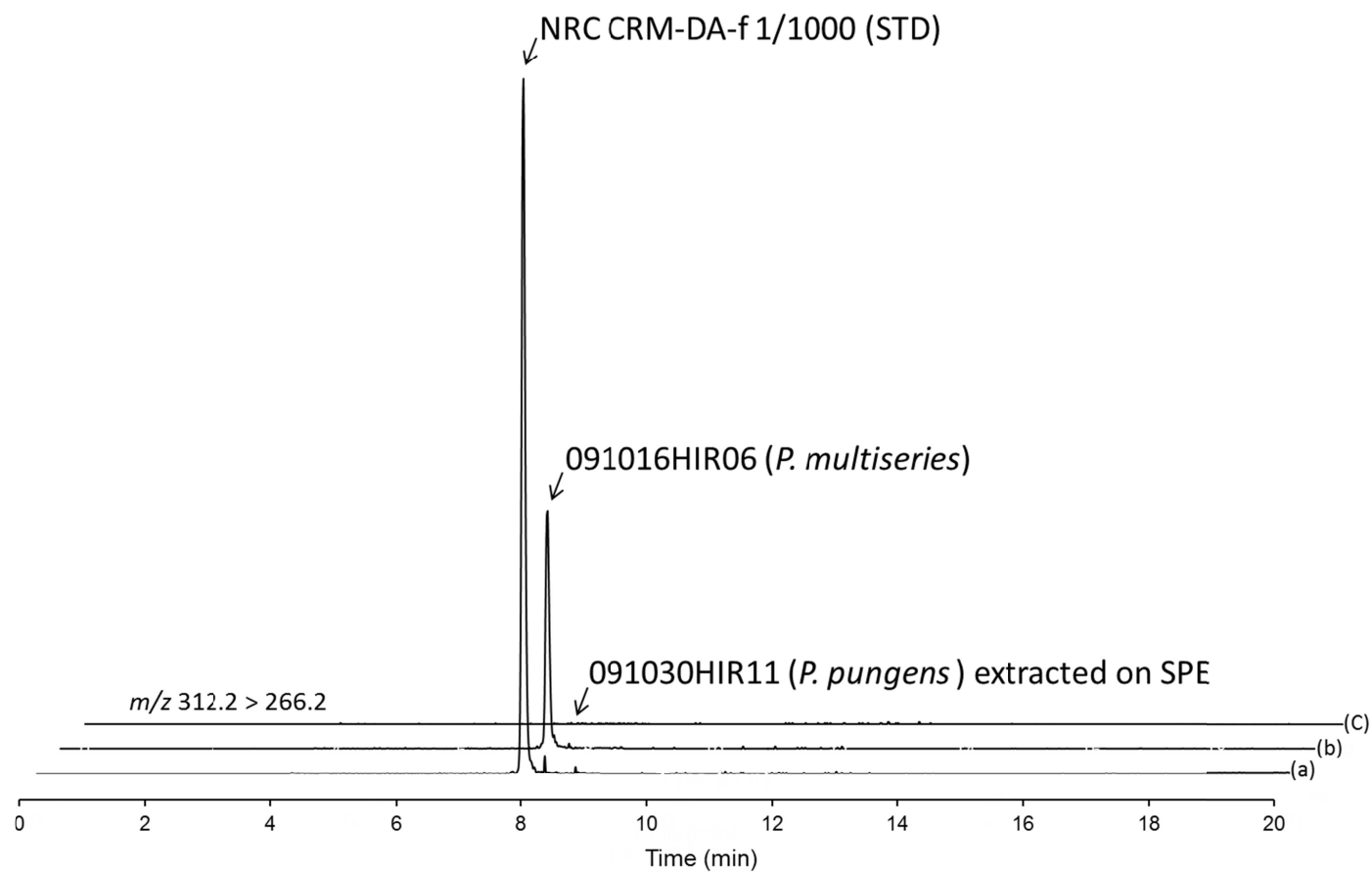


Fig.29 MRM LC/MS/MS chromatograms of standard domoic acid (A), culture medium of *Pseudo-nitzschia multiseriata* (B), *Pseudo-nitzschia pungens* 5 times SPE extract (C).

Table.11 Domoic acid cellular contents in cultured *Pseudo-nitzschia* spp.

strain	species	cell density (cells/mL)	DA_concentration (pg/ cell )
0906HIR01	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	9100	$\leq 0.020$ (ND)
0906HIR03	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	4800	$\leq 0.039$ (ND)
0906HIR04	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	7200	$\leq 0.026$ (ND)
0906HIR06	<i>Pseudo-nitzschia multiseriis</i>	13600	$\leq 0.013$ (ND)
0906HIR07	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	5800	$\leq 0.032$ (ND)
0907ABA01	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	4100	$\leq 0.046$ (ND)
0907ABA02	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	3700	$\leq 0.051$ (ND)
0907ABA03	<i>Pseudo-nitzschia calliantha</i>	22400	$\leq 0.008$ (ND)
0907ABA04	<i>Pseudo-nitzschia cf. hemeii</i>	6900	$\leq 0.027$ (ND)
0907ABA06	<i>Pseudo-nitzschia calliantha</i>	21100	$\leq 0.008$ (ND)
0907ABA08	<i>Pseudo-nitzschia calliantha</i>	17400	$\leq 0.010$ (ND)
091016HIR01	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	9000	$\leq 0.021$ (ND)
091016HIR02	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	10300	$\leq 0.018$ (ND)
091016HIR03	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	8500	$\leq 0.022$ (ND)
091016HIR05	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	8200	$\leq 0.023$ (ND)
091016HIR06	<i>Pseudo-nitzschia multiseriis</i>	14700	0.599
091016HIR07	<i>Pseudo-nitzschia multistriata</i>	2000	0.593
091016HIR09	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	6600	$\leq 0.028$ (ND)
091030HIR11	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	19700	$\leq 0.009$ (ND)
091030HIR12	<i>Pseudo-nitzschia multiseriis</i>	9800	0.575
091127HIR01	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	4500	$\leq 0.042$ (ND)
091127HIR02	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	4300	$\leq 0.043$ (ND)
091127HIR03	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	2900	$\leq 0.065$ (ND)
091127HIR04	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	4900	$\leq 0.038$ (ND)
091127HIR06	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	6700	$\leq 0.028$ (ND)
091127HIR07	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	5800	$\leq 0.032$ (ND)
091127HIR08	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	3300	$\leq 0.057$ (ND)
091127HIR09	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	3800	$\leq 0.049$ (ND)
091127HIR11	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	4000	$\leq 0.047$ (ND)
091127HIR13	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	2800	$\leq 0.067$ (ND)
091213HIR01	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	5800	$\leq 0.032$ (ND)
091213HIR02	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	5300	$\leq 0.035$ (ND)
091213HIR03	<i>Pseudo-nitzschia multiseriis</i>	5700	1.197
091213HIR04	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	6400	$\leq 0.029$ (ND)

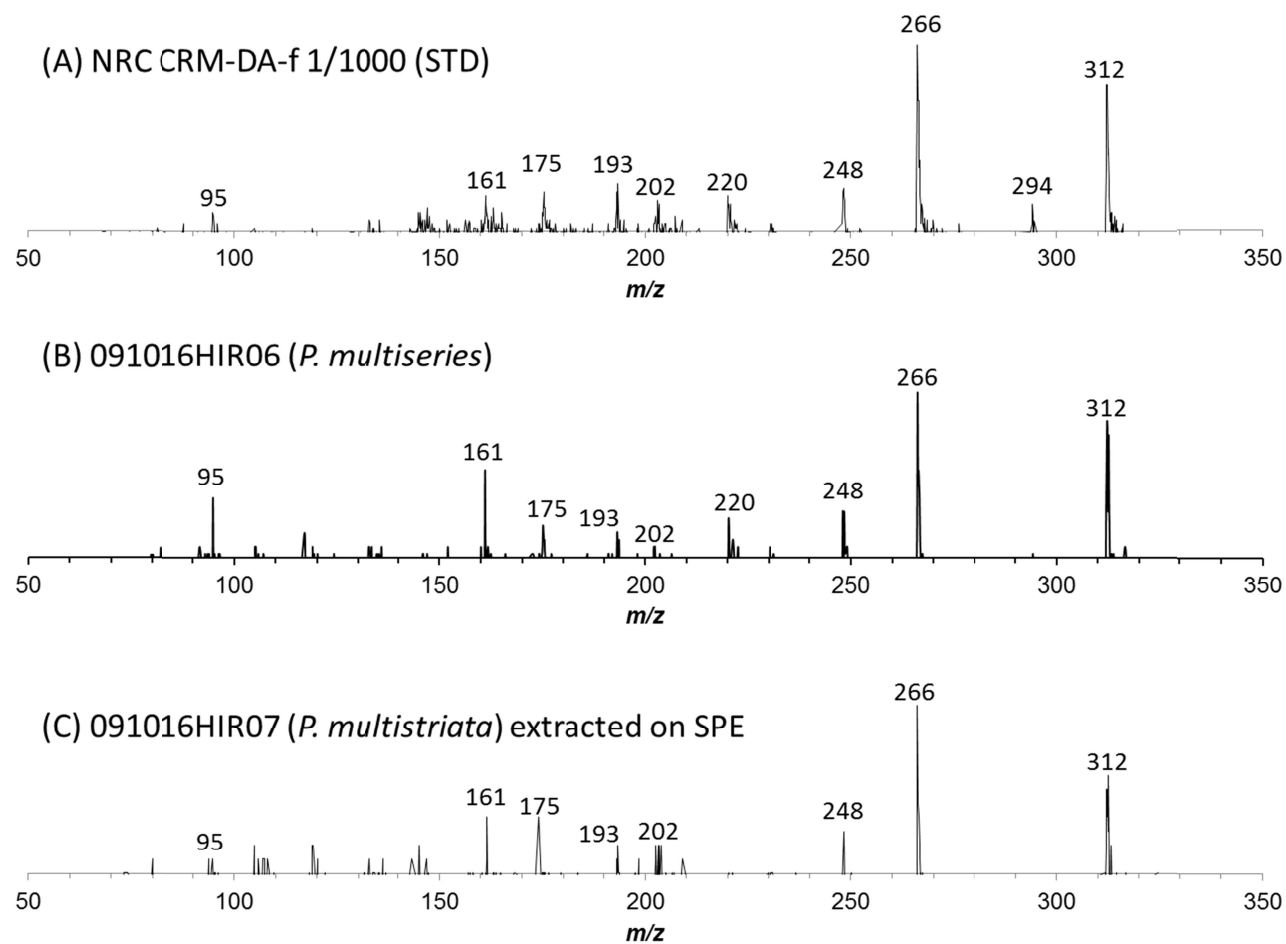


Fig.30 Full scan linear ion trap MS/MS spectrum obtained for  $[M+H]^+$  of domoic acid standard (A) and cultured *Pseudo-nitzschia multiseriata* (B), cultured *Pseudo-nitzschia multiseriata* (C).

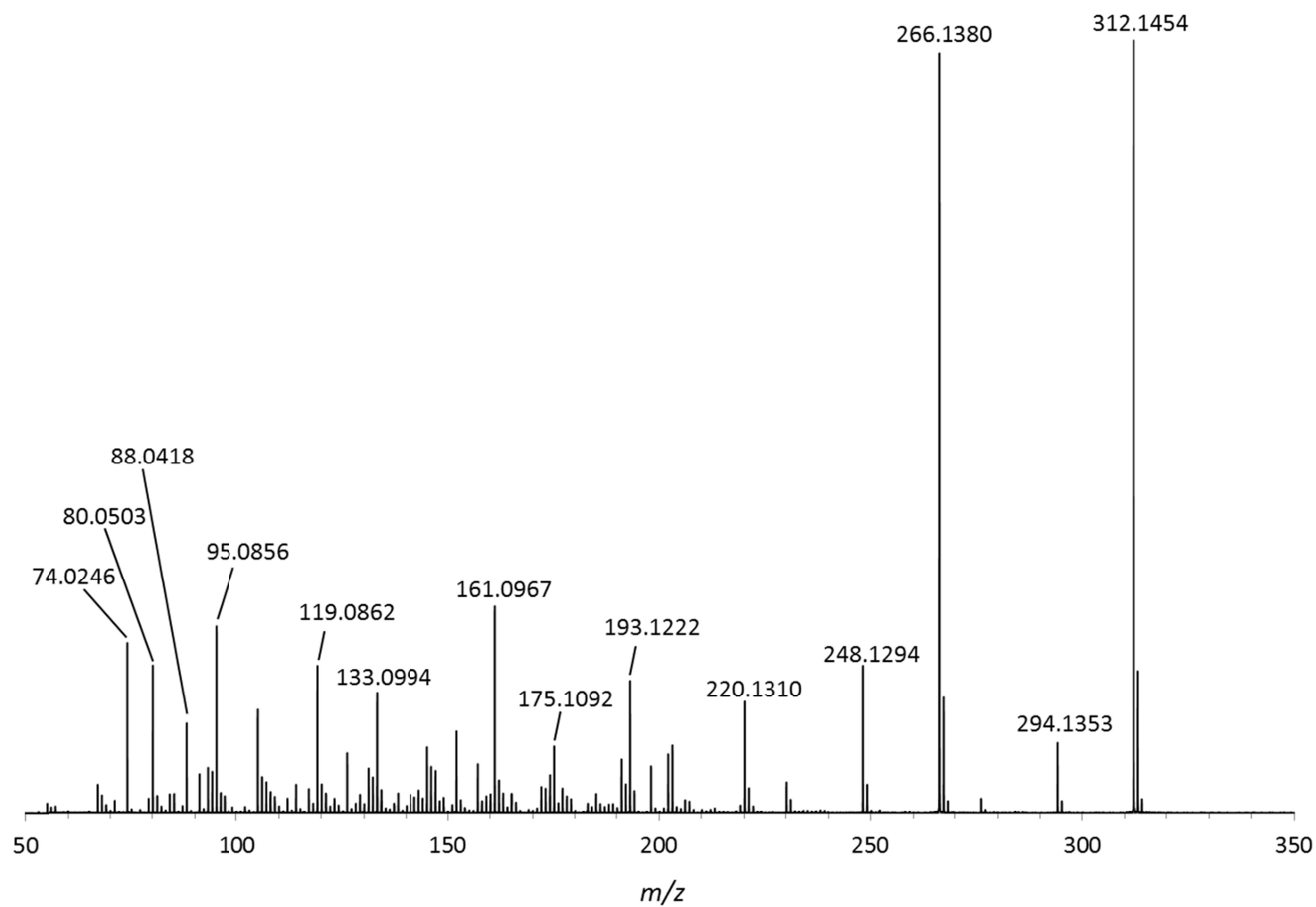


Fig.31 High-resolution MS/MS product ion spectrum obtained for  $[M+H]^+$  ions of authentic domoic acid

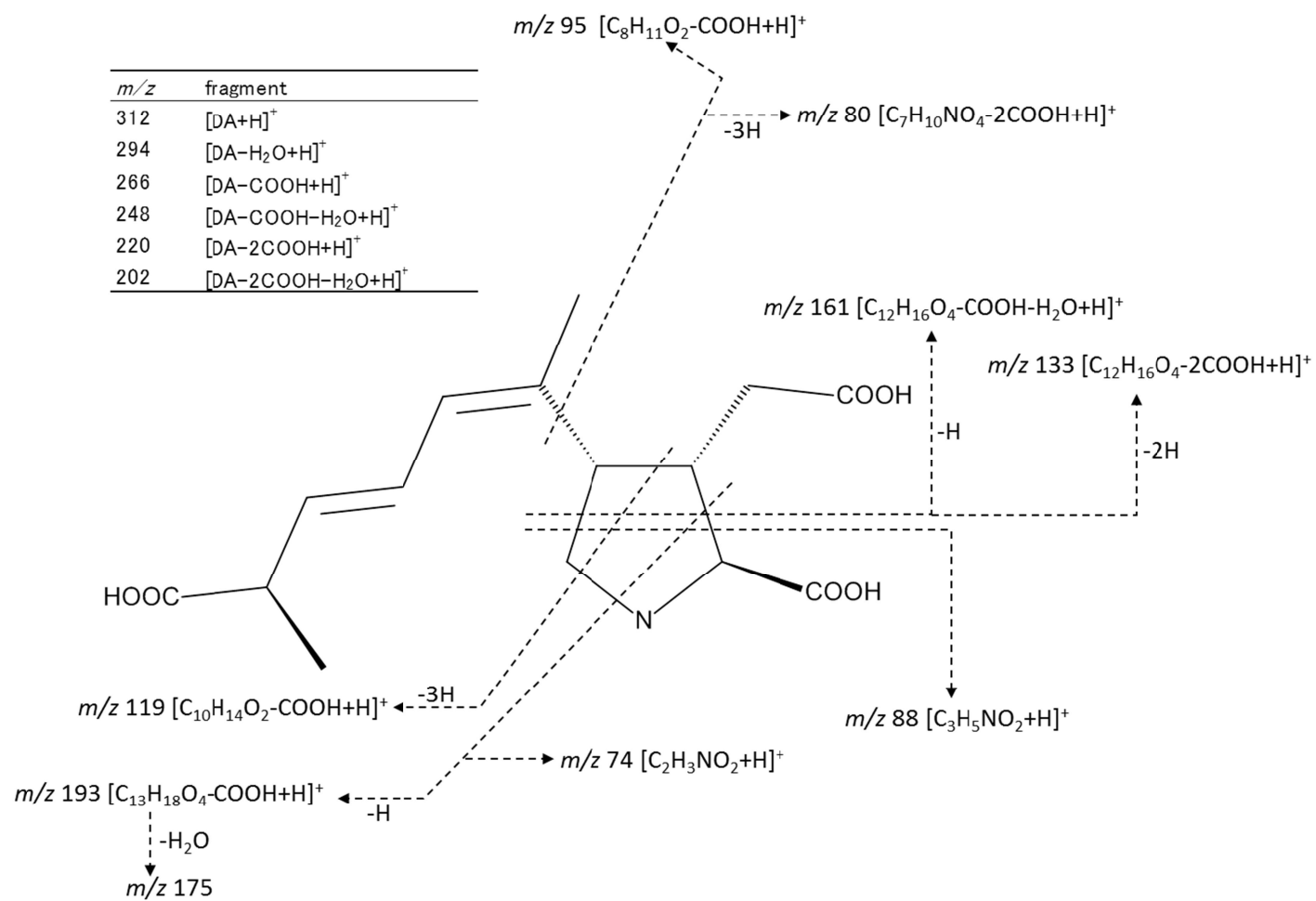


Fig 32. Fragmentation diagram of qTOF MS/MS spectra obtained for domoic acid.

## 第 4 章

### LC/MS/MS 分析による有毒渦鞭毛藻類 *Ostreopsis ovata* が 生産するパリトキシン類縁体の探索・構造解析

ここでは、第 3 章に引き続き LC/MS/MS 法を利用した有毒成分の分析について述べる。底生有毒渦鞭毛藻 *Ostreopsis ovata* はパリトキシン(PLTX)類縁体のオバトキシン(OVTX)群を生産する。国内で採集した *O. ovata* の培養株(S0752)の抽出液とイタリア地中海で採集した OVTX 群生産株(KAC85)の抽出液を LC/MS/MS 分析により比較し、国内産 *O. ovata* の OVTX 群の詳細を調べた。同じ質量数を有する OVTX において LC による保持時間が異なることから、国内で採集した *O. ovata* が生産する OVTX 群は、イタリア地中海の *O. ovata* が生産する OVTX 群の異性体であることが明らかになった。LC/QTOFMS を用いて国内で採集した *O. ovata* が生産する新規 PLTX 類縁体を検索するとともに、主要成分である OVTX-a の異性体について、LC/QTOFMS による MS/MS 分析によってその化学構造を推定した。

## 試料および方法

### 試薬

メタノールおよびアセトニトリルは高速液体クロマトグラフィー用を用いた(和光純薬工業, 大阪)。98%ギ酸 (ナカライテスク, 京都)は精密分析用を用いた。超純水は、EASY Pure® RODI System(Barnstead, USA)により製造した

### PLTX 標準品

PLTX(和光純薬工業 生化学試験用) 100 µg を 50% メタノール/水 (1:1, v/v) 1 mL に溶解し、1 µg/mL, 10 µg/mL に 50%メタノールで希釈し、PLTX 標準液として使用した。

### 試料および抽出

日本国内の *O. ovata* は高知県大月町近海で採集した S0752 株 ( $4.47 \times 10^7$  cells)および既報の OVTX 群(Patrizia Ciminiello *et al.*

2010)を生産するイタリアで採集した KAC85 株( $9 \times 10^7$  cells)を用い、オストレオシン(OST)-dを生産する *Ostreopsis* 属培養株として S0587 株( $3.98 \times 10^6$  cells)を用いた。分析に用いた培養株の種同定および培養条件については既報で報告したとおりである (Sato et al., 2011)。遠心分離によって集藻したペレットに対し 9 倍量のメタノールを加え超音波破碎によって PLTX 類縁体を抽出した。メタノール抽出液は 2000 g で 5 分間遠心分離を行い、上清をミニザルト RC4 フィルター 0.45  $\mu$ m(Sartorius, Germany)で濾過したものを LC/MS/MS および LC/QTOFMS により分析した。また OVTX 群の保持時間を比較のため等量の S0752 株、KAC85 株のメタノール抽出液を混合した試料を調製した。

#### トリプル四重極 LC/MS/MS 分析

液体クロマトグラフとして Agilent 1200 モデル (Agilent technology, USA)、ハイブリットトリプル四重極/リニアイオントラップ質量分析計として 3200 Qtrap (AB Sciex, USA)を使用した。分離条件として、カラムは Hypersil BDS C8 (粒径 3 $\mu$ m) $\phi$ 2.1 $\times$ 150 mm (Thermo Scientific, USA)を使用した。移動相は A 液として 50 mM ギ酸, 2 mM のギ酸アンモニウムを含む超純水, B 液として 50 mM ギ酸, 2 mM のギ酸アンモニウムを含むアセトニトリル: 超純水 (95:5, v/v) の 2 相を用いた。カラム温度は 20 度に保ち、グラジエント条件は 15 分間で 5% B から 100% B にし、5 分間 100% B を流速 0.2 mL/min で、PLTX 類縁体を分離した。カラムの平衡化は 5% B で 5 分間行った。

質量分析のイオン化は ESI の陽イオンモードで行い、MRM 分析条件としてキャピラリー電圧 4500V; イオン源温度 200 $^{\circ}$ C; declustering potential (DP) 50 V; Collision energy(CE)は 50 V で測定した。PLTX および PLTX 類縁体の  $[M-H_2O+2H]^{2+}$  を Q1 より選択し、Q2 より生じたプロダクトイオンを Q3 で選択し、検出した。MRM イオンチャンネル(Q1>Q3)は PLTX:  $m/z$  1331>327; OVTX-a:  $m/z$  1315>327; OVTX-b:  $m/z$  1337>371; OVTX-c:  $m/z$  1345>371; OVTX-d:  $m/z$  1323>327; OVTX-e:  $m/z$  1323>343; OST-d:  $m/z$  1309>313 を検出した。また、PLTX 群の定性分析として Enhanced Product Ion Scan (EPI)による  $[M-H_2O+2H]^{2+}$  を対象とした MS/MS 分析により、CE 50 V で生じるプロダクトイオンを測定した。



## LC/QTOFMS 分析

液体クロマトグラフとして Ultimate 3000 モデル (Thermo Dionex, USA) を使用し、質量分析装置として micrOTOF-Q II (Bruker Daltonics, Germany) を使用した。

PLTX 類縁体の MS スペクトルを得るための分離条件として、カラムは Hypersil BDS C8 (粒径 3 $\mu$ m)  $\phi$ 2.1  $\times$  150 mm (Thermo Scientific, USA) を用いた。移動相は A 液として 0.1% ギ酸を含む超純水、B 液として 0.1% ギ酸を含む 95% アセトニトリル/超純水 (95 : 5, v/v) の 2 相を用いた。カラムオーブンは 30 $^{\circ}$ C に保ち、グラジエント条件として 30% B で 30 分間保ち、5 分間で 30% B から 100% B にし、15 分間 100% B を流速 0.2 mL/min で PLTX 類縁体を分離した。カラムの平衡化は 30% B で 12 分間行った。

QTOFMS 条件は ESI によりイオン化し、陽イオンモードで測定した。測定条件としてキャピラリー電圧 4500V; ドライヒーター 200 $^{\circ}$ C; ドライガス 8 L/min; ネブライザーガス 1.6 bar; collision RF 値 3000 Vpp; スキャンレンジ  $m/z$  1000~3000 で測定した。イタリアの *O. ovata* から見つかった既報の OVTX 群について  $[M+H+Na]^{2+}$  を対象にイオン抽出し、検索した。さらに新規 PLTX 類縁体を  $[M-A \text{ moiety}-3H_2O+H]^+$  を対象に検索した。

LC/QTOFMS による MS/MS 分析の分離条件としてカラムは Acquity UPLC BEH C8 (粒径 1.7  $\mu$ m)  $\phi$ 2.1  $\times$  50 mm (Waters, USA) を使用した。移動相は MS スペクトルの解析と同じものを用い、グラジエント条件として、2 分間で 5% B から 100% B にし、3 分間 100% B でカラムを洗浄した。カラムは 5% B を 1 分間流し平衡化した。流速は 0.4 mL/min で行い、PLTX 類縁体は約 2.0~2.3 min にカラムから溶出した。

MS/MS 分析条件はプリカーサーイオンとして PLTX 類縁体の  $[M-H_2O+2H]^{2+}$  を対象に、キャピラリー電圧 4500V; ドライヒーター 200 $^{\circ}$ C; ドライガス 8 L/min; ネブライザーガス 1.6 bar; collision RF 値 300/650 Vpp; Collision Energy 50/100 V; スキャンレンジ  $m/z$  50~3000 で測定した。

## 結果および考察

### MRM 分析による OVTX 群の分析

トリプル四重極 LC/MS/MS により測定した S0752 株の MRM クロマトグラムを (Fig.33) に示す。MRM 分析により S0752 株から数種の PLTX 群と推測される 1~7 のピークを検出した。PLTX の MRM イオンチャンネルに相当する  $m/z$  1331>327 を検出した (ピーク 7)。S0752 株中の主要な PLTX 群は OVTX-a の  $m/z$  1315>327 に相当するピークであり、OVTX-b (ピーク 2), -d (ピーク 4) および OVTX-e (ピーク 6) に相当するピークも検出した。ピーク 3 およびピーク 5 は保持時間およびピーク強度から OVTX-a (ピーク 5) および OVTX-b (ピーク 3) の  $[M+2H]^{2+}$  の安定同位体由来するピークを検出したと考える。また S0587 株から OST-d に相当するピークを検出した (Fig.34)。

日本沿岸で採集した S0752 株の生産する OVTX 群とイタリアで採集した既報の OVTX 群を生産する KAC85 株を比較するため、S0752 株と KAC85 株メタノール抽出液を等量混合した試料の MRM クロマトグラムを (Fig.35) に示す。OVTX-a, -b, -d, -e に相当する MRM イオンチャンネルにおいて、S0752 と KAC85 株に含まれる OVTX 群はクロマトグラム上で分離して検出された。このことから S0752 株に含まれる OVTX 群は KAC85 株に含まれる OVTX-a, -b, -d, -e の異性体と推定した。S0752 株に含まれる OVTX 群は OVTX-aAC, -bAC, -dAC, -eAC (AC = Adachi Culture) とした。

EPI による PLTX 標準品 1  $\mu\text{g/mL}$  および OST-d, OVTX-a, -aAC, -b の MS/MS スペクトルを (Fig.36) に示す。PLTX および PLTX 類縁体から得られる MS/MS スペクトルは  $m/z$  1200-1300 に  $[M-nH_2O+2H]^{2+}$  の連続した脱水ピークが検出され、 $m/z$  726, 744, 876, 804 は PLTX 群から共通して得られる特徴的なフラグメントである。PLTX および OVTX-a, -aAC は共通して  $m/z$  327 が観測され、C8-C9 の開裂 (Fig.37) により生じるフラグメントイオンである (Ciminiello *et al.* 2008)。一方、OST-d では C8-C9 のフラグメントイオンが  $m/z$  313 (-14 amu) にシフトし、既報の C3 位のメチル基の欠損と一致する (Usami *et al.* 1995, Ukena *et al.* 2001, 2002)。また OVTX-b では  $m/z$  371 (+44 amu) にシフトし、PLTX の A moiety に  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$  が付与した構造を持つと推測した。PLTX および

OVTX-aAC の MS/MS スペクトルの詳細な解析は LC-QTOFMS 分析より得た MS/MS スペクトルを用い後述する。

#### LC/QTOFMS による OVTX 群の分析

LC/QTOFMS で測定した PLTX 標準品 10 µg/mL の MS スペクトル (Fig.38) より  $[M+H+Na]^{2+}$ ,  $[M+H]^+$  および PLTX がイオン化の際に開裂したフラグメントイオン  $[M-A \text{ moiety}-3H_2O+H]^+$  が強く観測された (Fig.37)。これらのイオンは PLTX の分子量と構造を推定するために重要なイオンである。

国内で採集した S0752 株およびイタリアで採集した KAC85 株の移動相組成 30% B 条件で測定したトータルイオンクロマトグラム (TIC) から既知の OVTX 群について、 $[M+H+Na]^{2+}$  のイオンを抽出した。抽出イオンクロマトグラム (EIC) により KAC85 株から OVTX a, b, d, e に相当するピークを検出し (Fig.39-41)、S0752 株からも OVTX-aAC, -dAC, -eAC に相当するピークを検出した (Fig.42, 43)。KAC85 株から OVTX-b と一致する MS スペクトルが得られたが (Fig.44)、S0752 株からは OVTX-bAC に相当するピークは検出されなかった。LC/QTOFMS 分析により、S0752 株に含まれる OVTX-aAC, -dAC, -eAC は KAC85 株に含まれる OVTX -a, -d, -e と MS スペクトルが一致し (Fig.45-47)、異性体であることを確認した。

#### 新規 PLTX 類縁体の検索

PLTX はイオン化する際に C8-C9 において開裂し  $[M-A \text{ moiety}-3H_2O+H]^+$  のフラグメントイオン  $m/z$  2282 が強く検出される (Fig.38)。また OVTX 群については同様に C8-C9 の開裂に由来する  $m/z$  2250 および  $m/z$  2266 のフラグメントイオン観測される (Fig.45-47)。S0752 株の TIC からフラグメントイオン  $m/z$  2250 および  $m/z$  2266 を抽出した EIC を (Fig.48, 49) に示す。OVTX-aAC, -dAC, -eAC の他に OVTX 群と類似した MS スペクトルを示す 4 種のピークを観測し、OVTX-UK1-4 とした (Fig.50, 51)。LC/TOFMS 分析により S0752 株から検出した PLTX 類縁体の各付加分子イオンおよびフラグメントイオンを (Table.12) に示す。OVTX-UK1-3 は OVTX-dAC と共通するフラグメントイオン  $m/z$  2266 が検出され、OVTX-UK4 からは OVTX-aAC, -eAC と共通する  $m/z$  2250 が検出された。

OVTX-UK2 は  $[M+H+Na]^{2+}$  の  $m/z$  1351 および推定される組成式は PLTX と一致するが、C8-C9 の開裂によるフラグメントイオンは PLTX と異なる。このことから MRM 分析 (Fig.33) により検出した PLTX と推定されるピーク 7 は OVTX-UK2 の  $[M+H-B \text{ moiety}-2H_2O]^+$  を検出したと推測され、新規 PLTX 類縁体であった。また LC/QTOFMS 分析では OVTX-bAC は検出されず OVTX b より -2 amu となる OVTX-UK4 が検出されており、MRM 分析より検出した OVTX-bAC は OVTX-UK4 の  $[M-H_2O+2H]^{2+}$  の安定同位体由来するピークを検出したと考える。

*O. ovata* の生産する OVTX 群は C8-C9 の開裂により OVTX-a, -b, -e と共通する  $m/z$  2250 および OVTX-d と共通する  $m/z$  2266 の 2 種のフラグメントイオンを生じる。これらのフラグメントイオンの検索により、検出した OVTX UK1-4 は  $[M+H+Na]^{2+}$  または  $[M+H]^+$  から推定される分子量から、これまで報告のない新規 PLTX 類縁体であることが明らかとなった。PLTX 類縁体は C8-C9 の開裂に由来するフラグメントイオンが強く観測され、この特徴的なフラグメントイオンにより新規 PLTX 類縁体を網羅的な検出が可能であると考えられる。

#### OVTX aAC の MS/MS による構造解析

PLTX 標準品および OVTX-aAC の  $[M-H_2O+2H]^{2+}$  ( $\pm 5$  amu) を対象とした MS/MS スペクトルを (Fig.52) に示す。 $m/z$  1200-1300 は 2 価のポリオール構造に由来する連続した脱水ピークであり、有益な構造情報は得られなかった。PLTX と OVTX-aAC に共通する 1 価のプロダクトイオンを (Table.13) に示す。PLTX と OVTX-aAC において C14-C15 の開裂に由来する  $m/z$  419 および C78-C79 の開裂に由来する  $m/z$  804 が共通して観測され、OVTX-aAC は C8'-C15, C78-C115 は PLTX と共通のフラグメントを持つことが推定される。次に PLTX と OVTX-aAC で異なるプロダクトイオンを (Table.14) に示した。OVTX-aAC は PLTX の C41-C42 の開裂に由来する  $m/z$  1013 および C49-C50 の開裂に由来する  $m/z$  1388 が -16 amu シフトした  $m/z$  997,  $m/z$  1372 が観測された。また C41 位のヒドロキシ基は C41-C42 の開裂に不可欠であることから OVTX-aAC は PLTX の C16-C20 のヒドロキシ基が欠損した構造を持つと考えられる。各プロダクトイオンは測定誤差である 5 ppm

の範囲で一致し、**PLTX** の構造に帰属した (Fig.53)。解析したフラグメントイオンは共役化により化学的に安定であり、フラグメンテーション規則における例外的なイオンは含まれていない。**OVTX-aAC** は **PLTX** より C16-C20, C53-C73 間でヒドロキシ基が欠損していると推定された。

化学構造の明らかな **PLTX** 群に対し、体系的にプロダクトイオンを帰属することで、**OVTX-aAC** において、共通およびシフトしたプロダクトイオンから新規類縁体の構造情報が得られた。

图 表

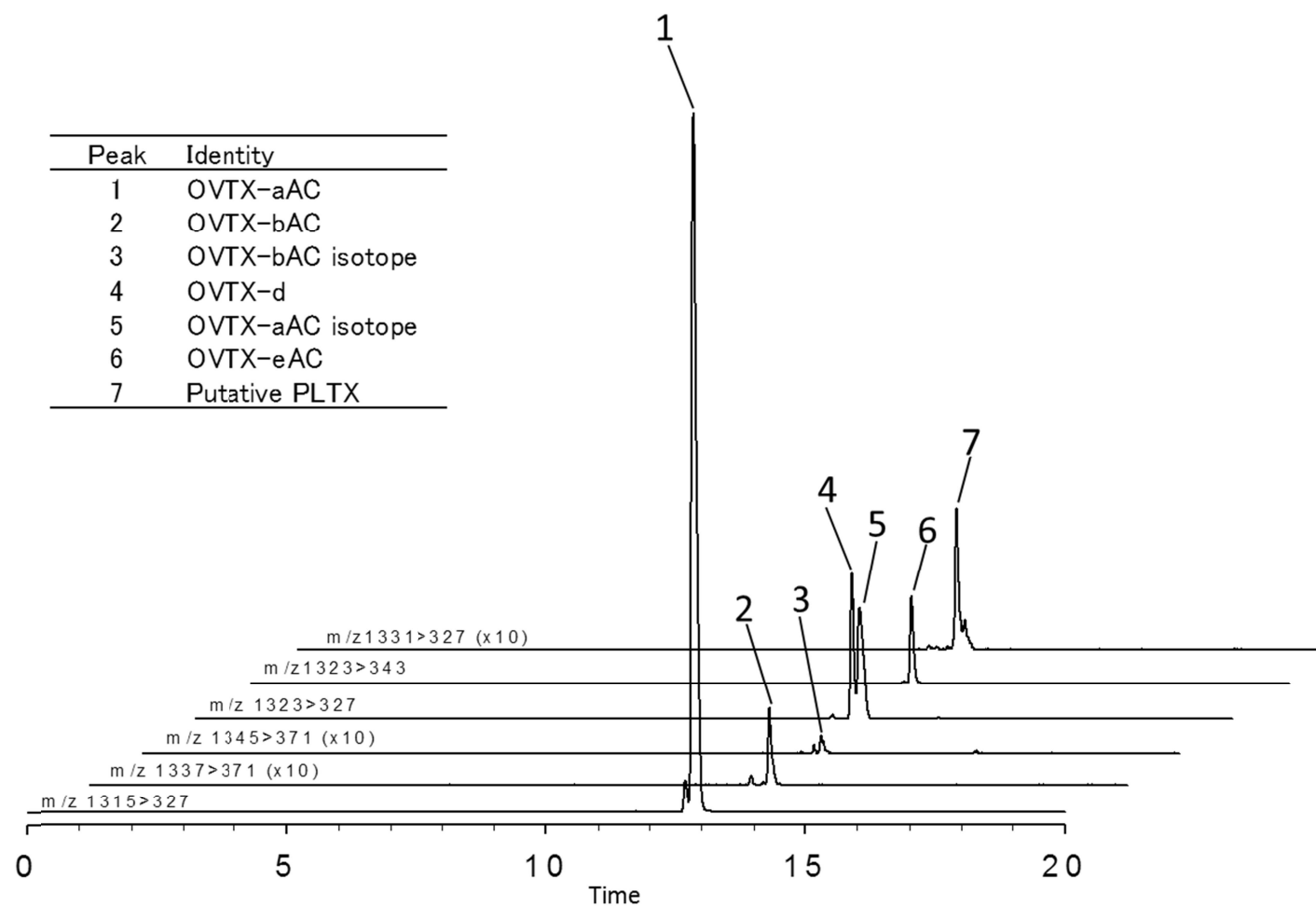


Fig33. MRM LC/MS/MS chromatogram of PLTX analogues from cultured *Ostreopsis* S0752 strain.

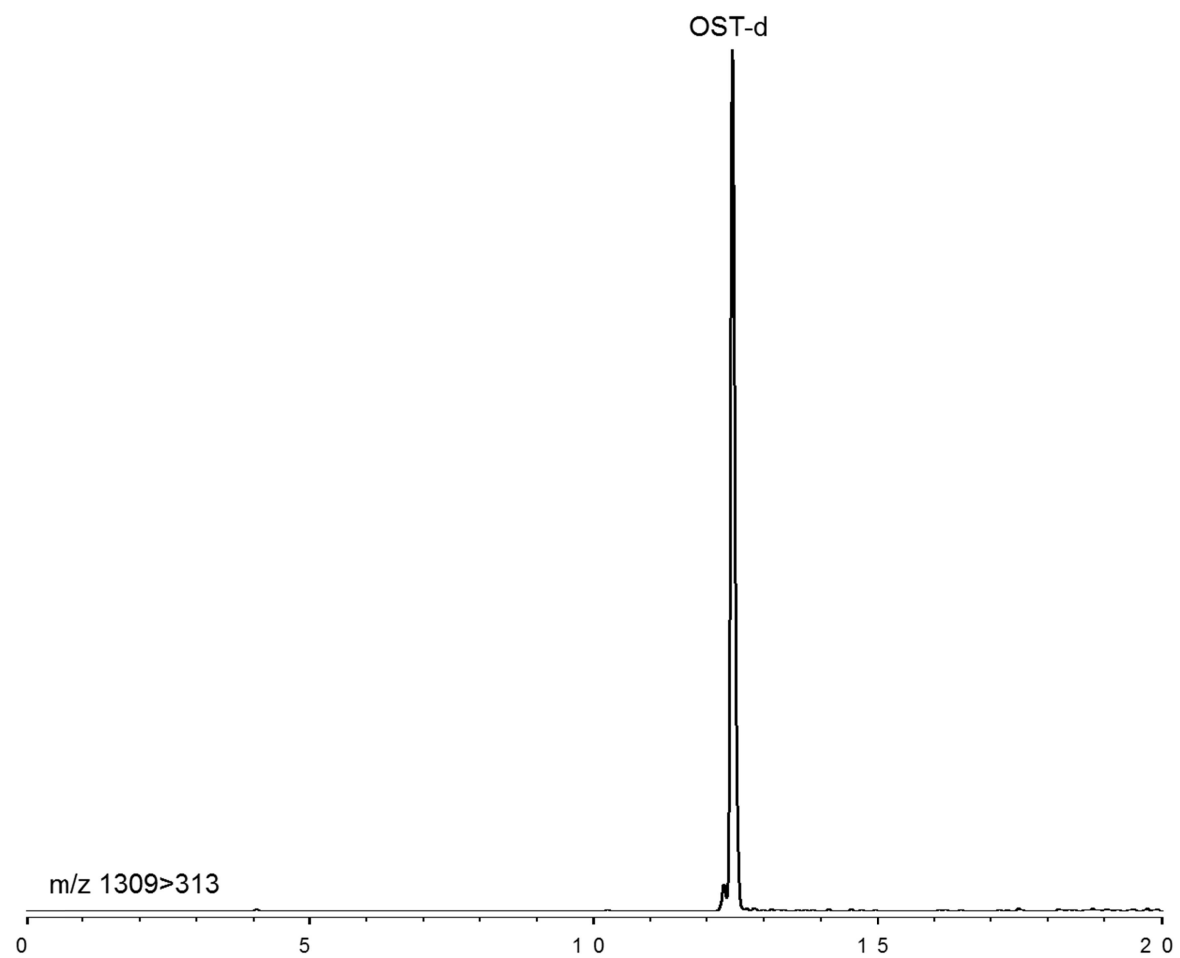


Fig.34 MRM LC/MS/MS chromatogram of OST-d in cultured *Ostreopsis* S0587 strain.

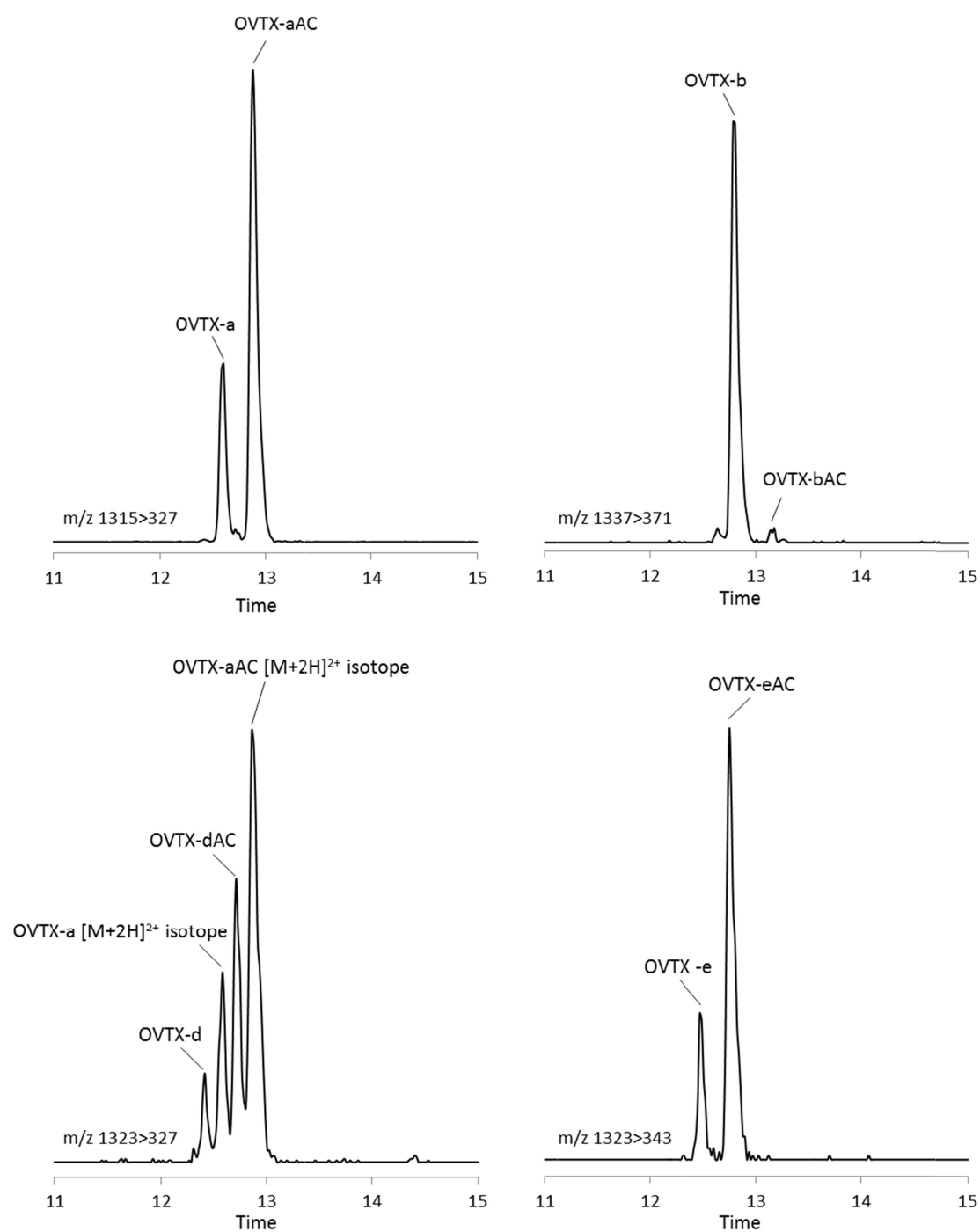


Fig.35 MRM LC/MS/MS chromatogram of PLTX analogues in cultured *Ostreopsis* mixtured KAC85 strain and S0752 strain.



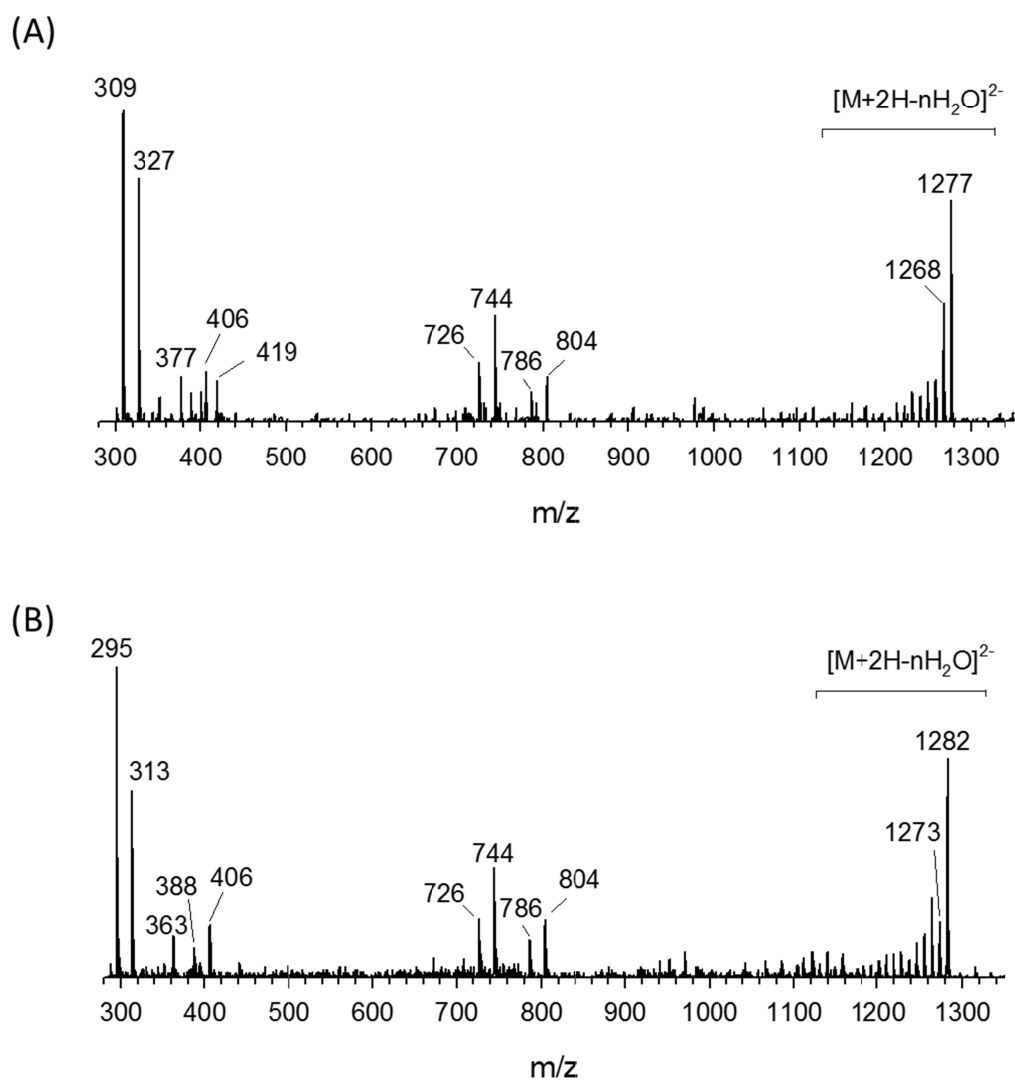


Fig.36a LC-MS/MS enhanced product ion spectra obtained for  $[M+2H-H_2O]^{2+}$  ions of palytoxin analogues.  
(A): Authentic PLTX; (B): OST-d

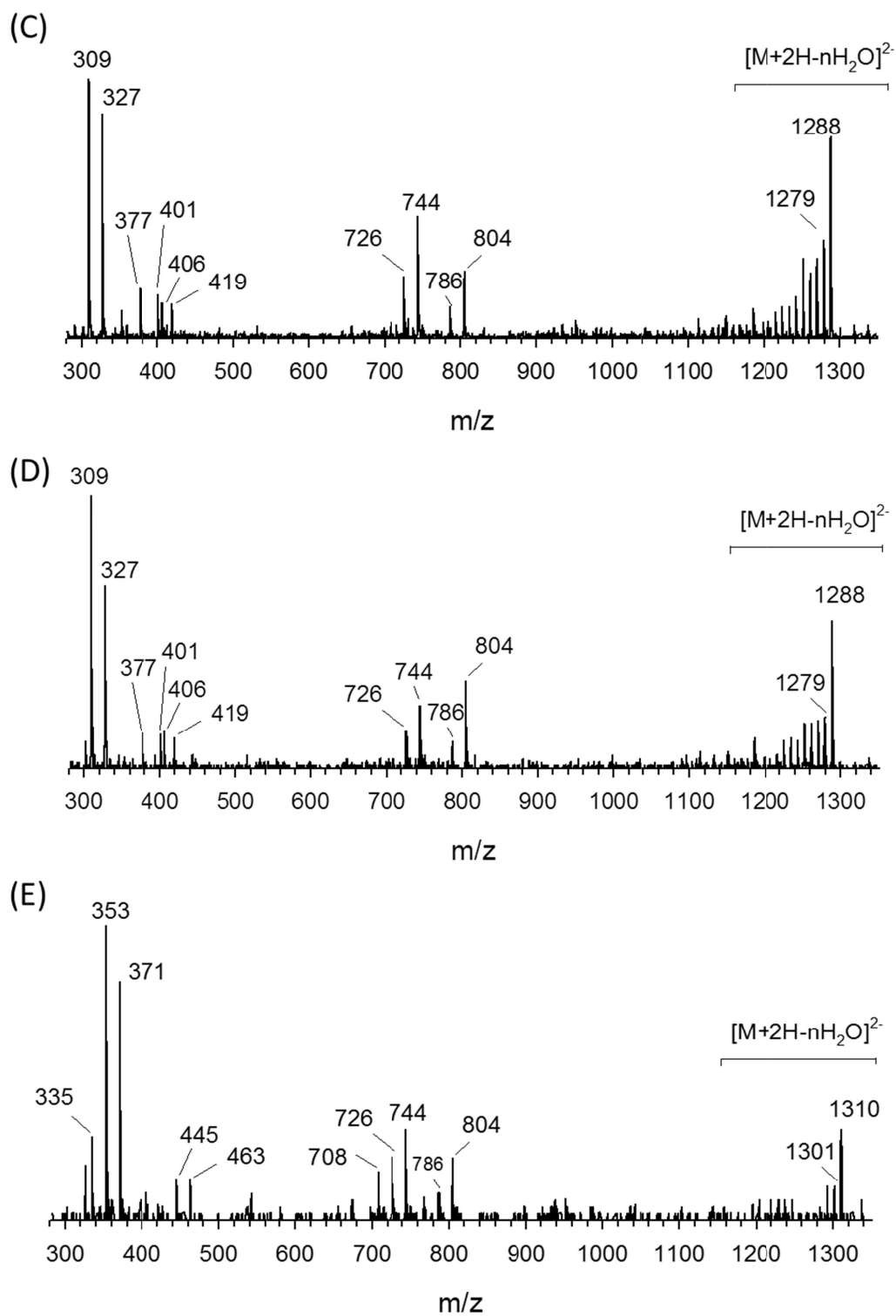


Fig.36b LC-MS/MS enhanced product ion spectra obtained for  $[M+2H-H_2O]^{2+}$  ions of palytoxin analogues.  
(C):OVTX-aAC; (D):OVTX-a; (E):OVTX-b

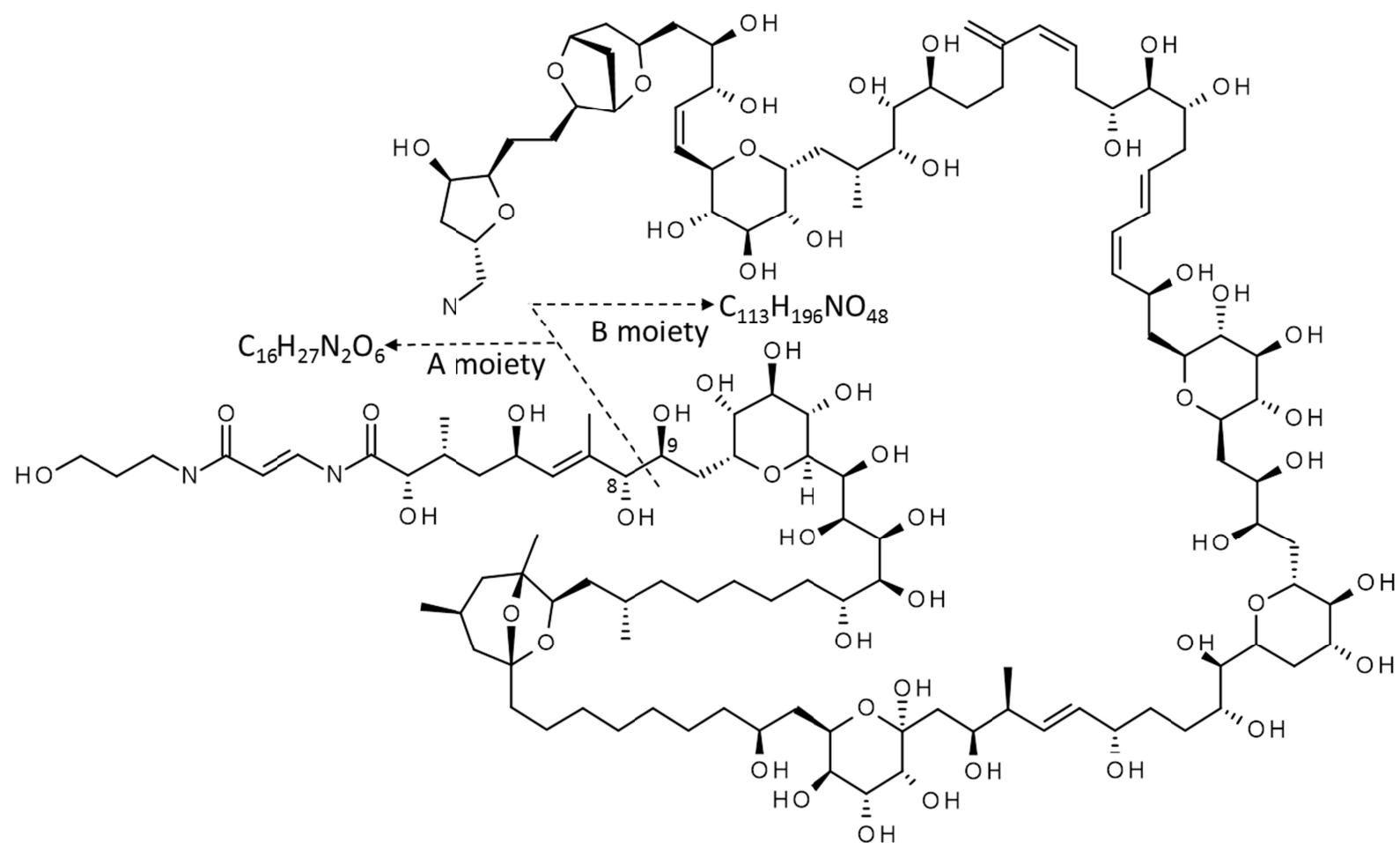


Fig.37 Insource fragmentation between C8 and C9 of authentic PLTX.

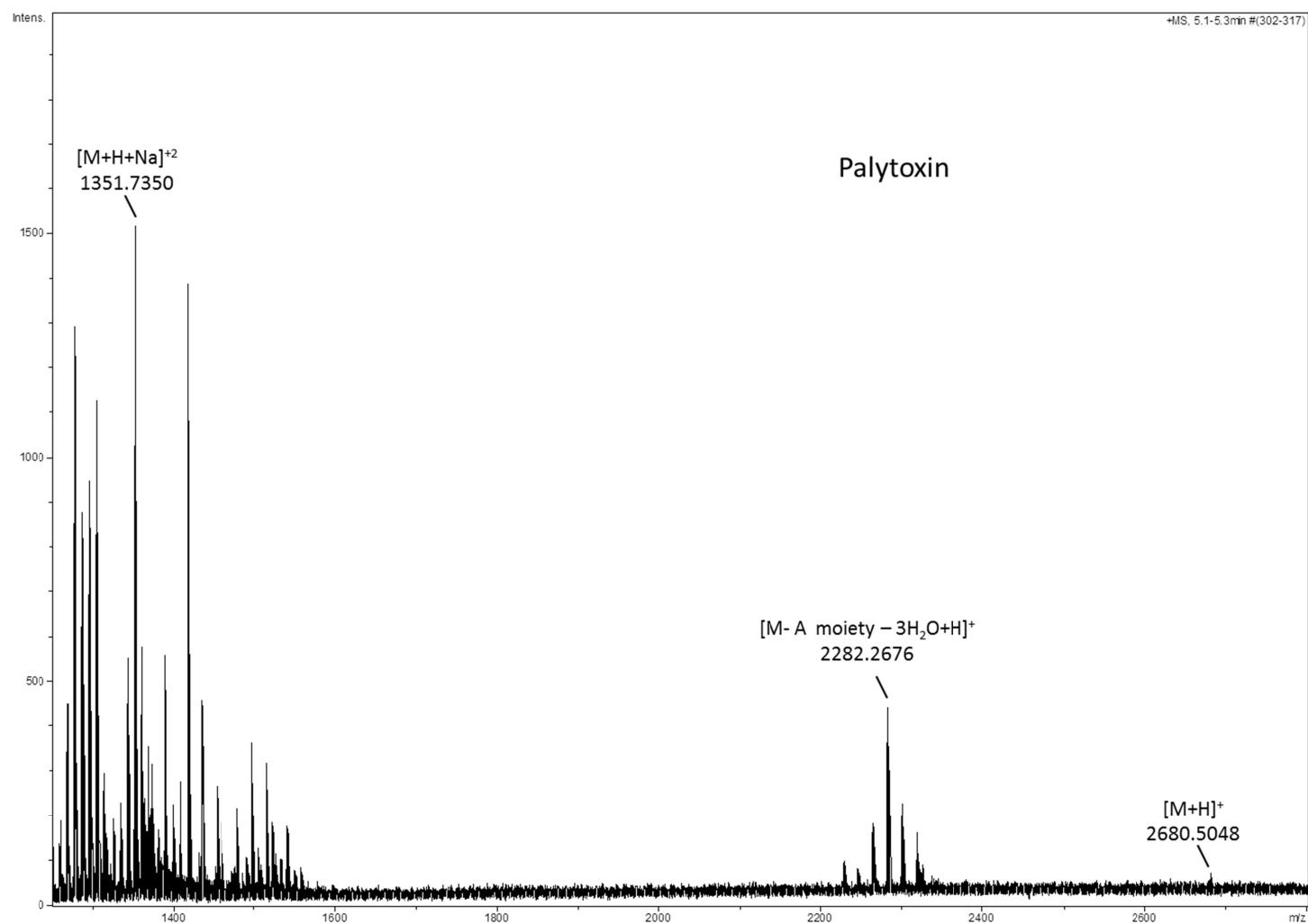


Fig.38 High-resolution MS spectra of authentic PLTX.

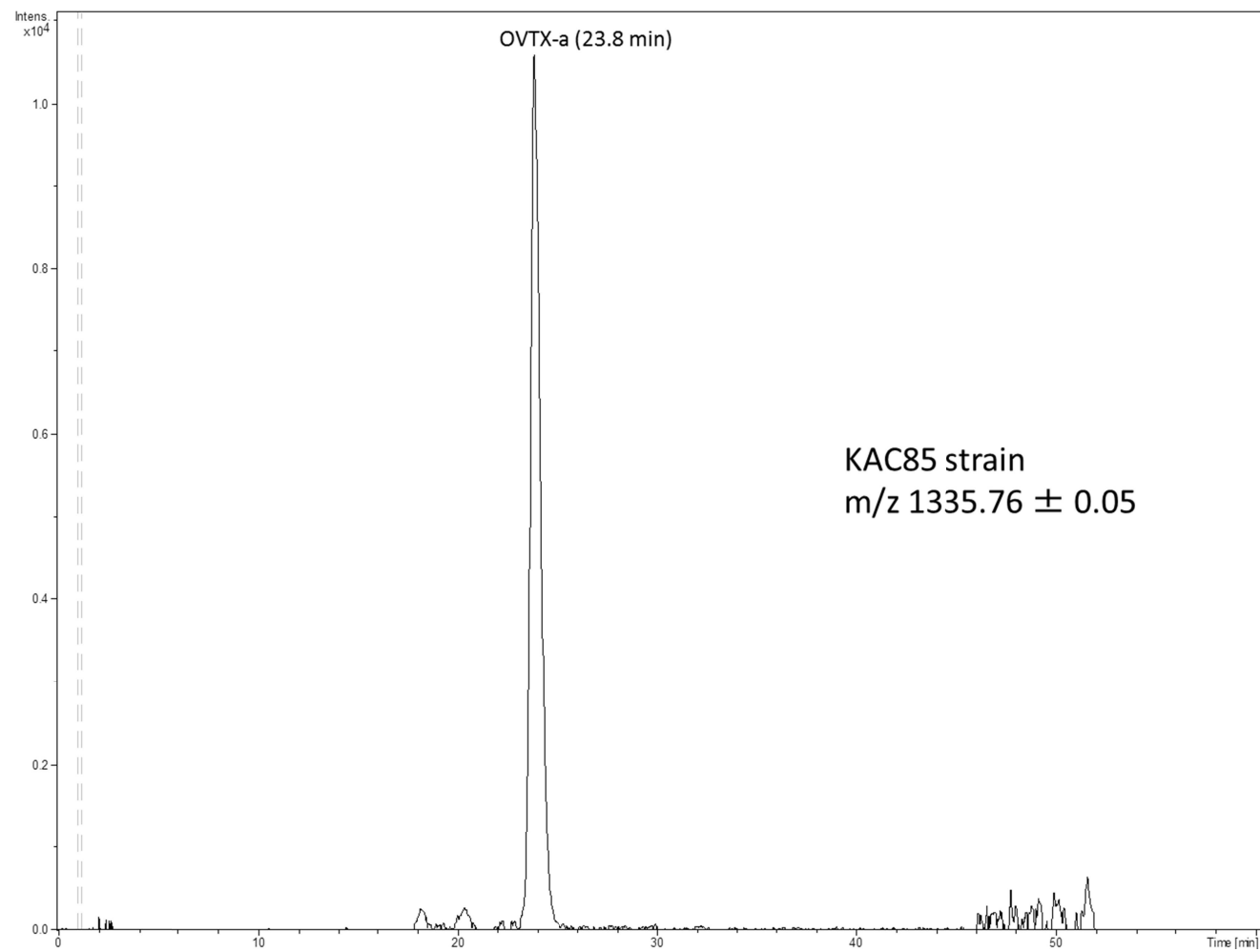


Fig.39 Extracted ion chromatogram of OVTX-a  $[M+Na+H]^{2+}$  ion from Italian *Ostreopsis* cultures (KAC 85 strain).

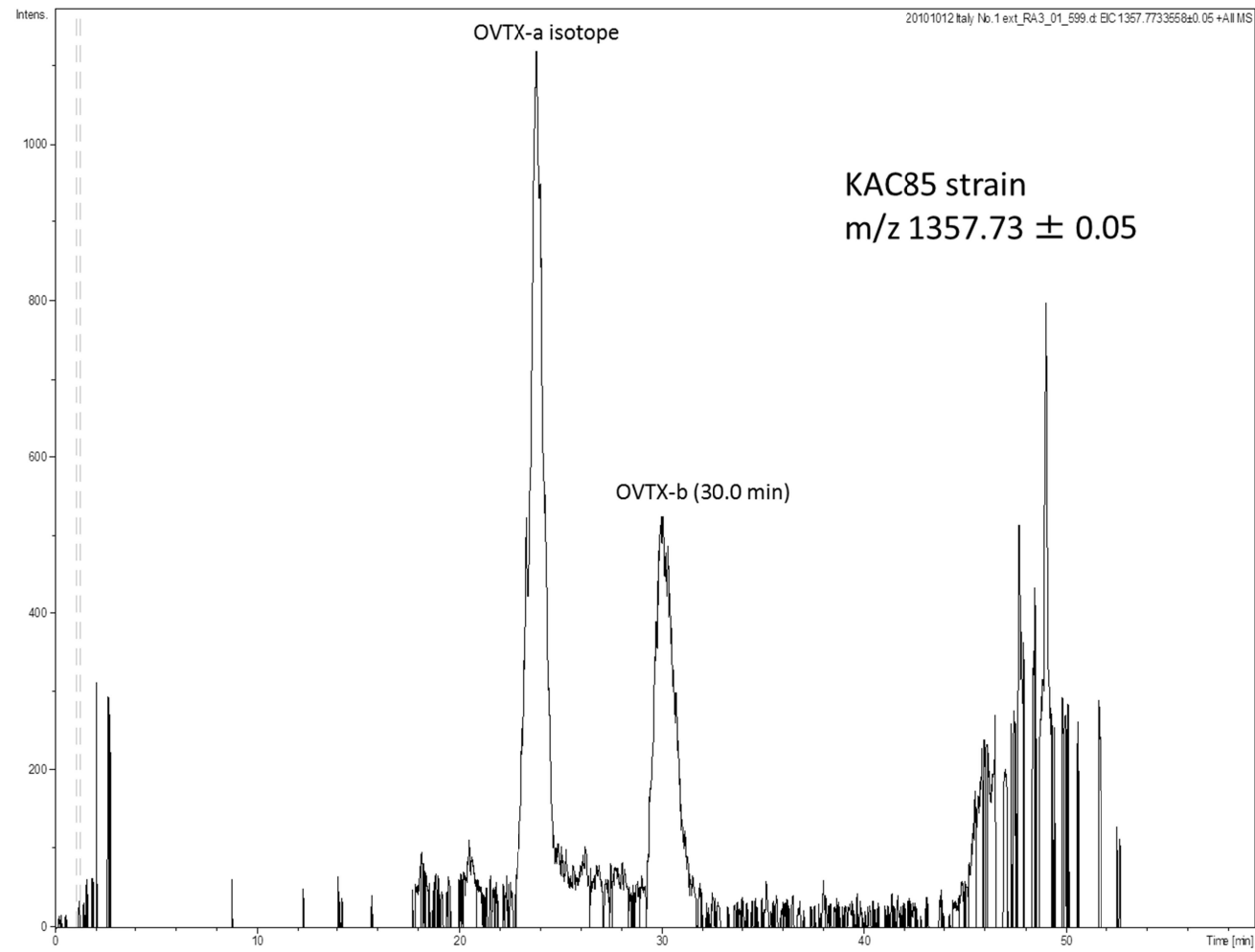


Fig.40 Extracted ion chromatogram of OVTX-b  $[M+Na+H]^{2+}$  ion from Italian *Ostreopsis* cultures (KAC 85 strain).

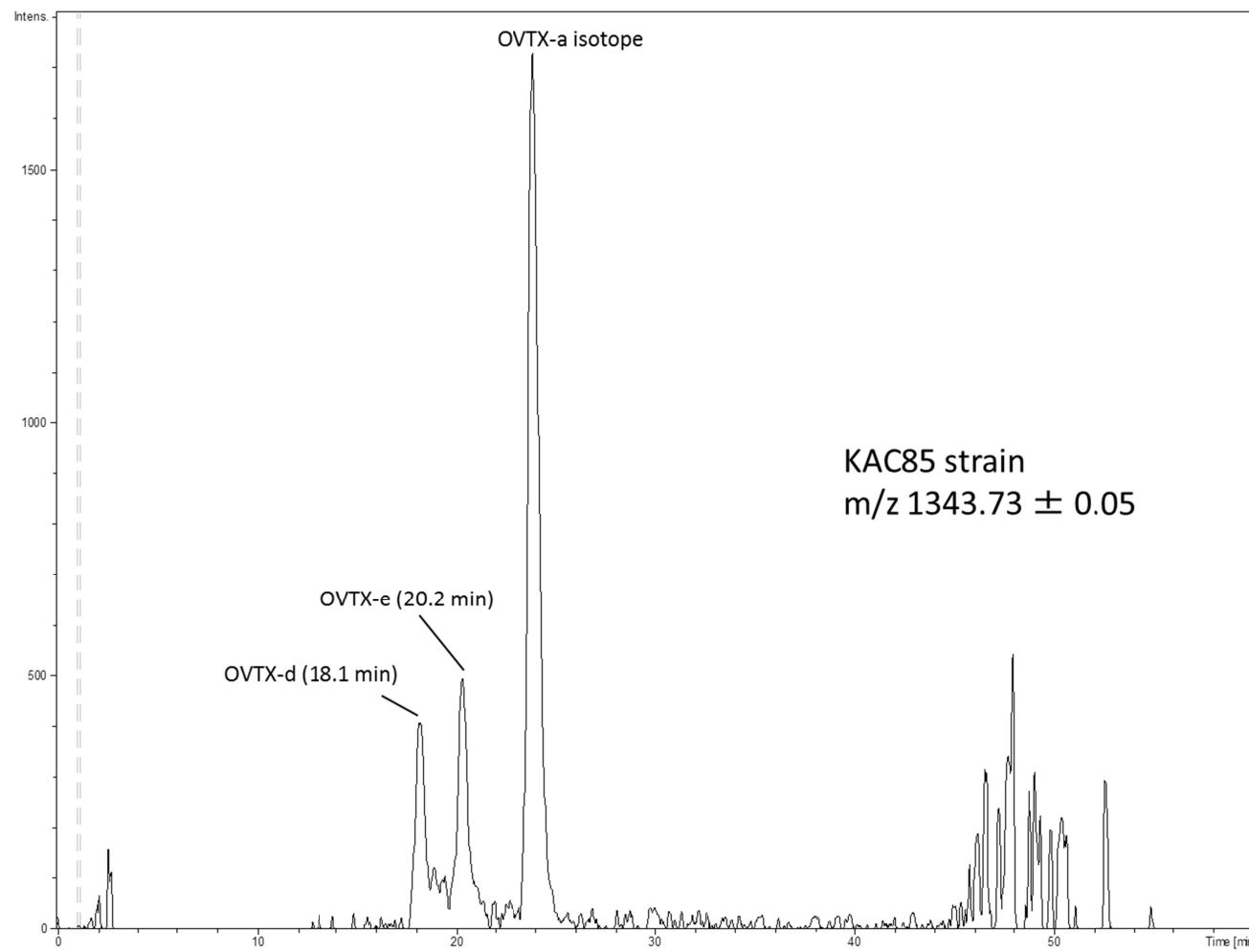


Fig.41 Extracted ion chromatogram of OVTX-d, -e  $[M+Na+H]^{2+}$  ion from Italian *Ostreopsis* cultures (KAC 85 strain).

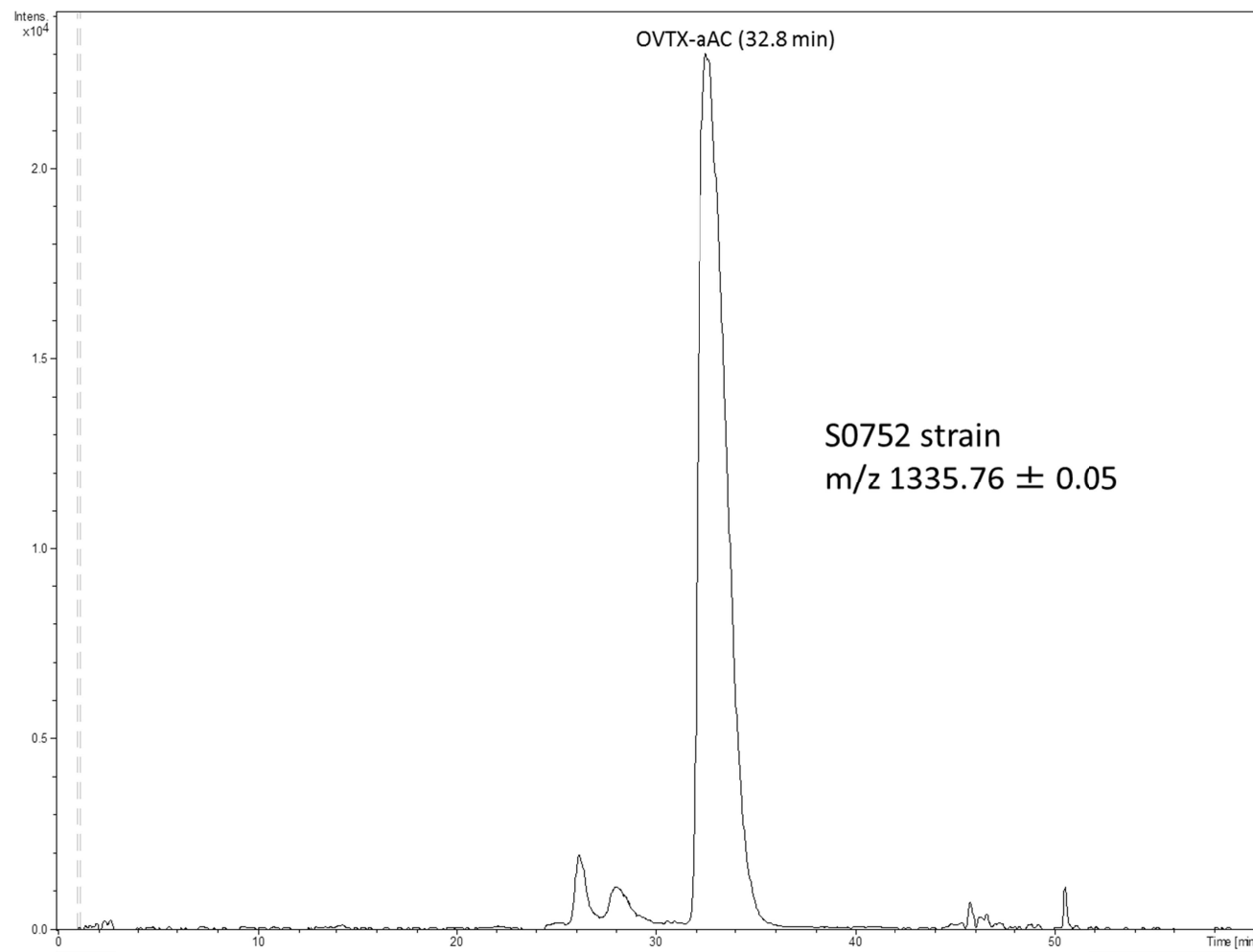


Fig.42 Extracted ion chromatogram of OVTX-aAC  $[M+Na+H]^{2+}$  ion from Japanese *Ostreopsis* cultures (S0752 strain).



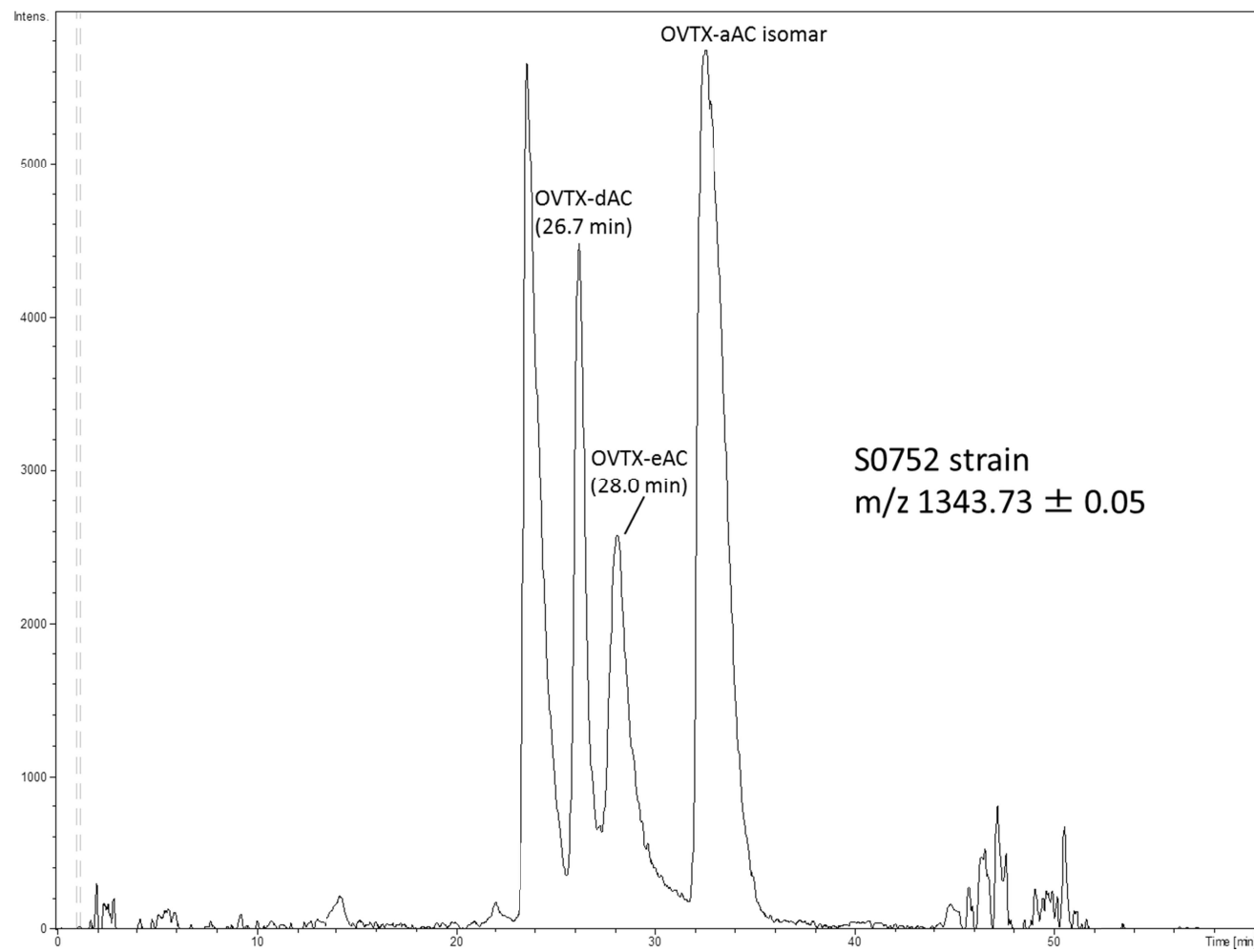


Fig.43 Extracted ion chromatogram of OVTX-d,-e  $[M+Na+H]^{2+}$  ion from Japanese *Ostreopsis* cultures (S0752 strain).

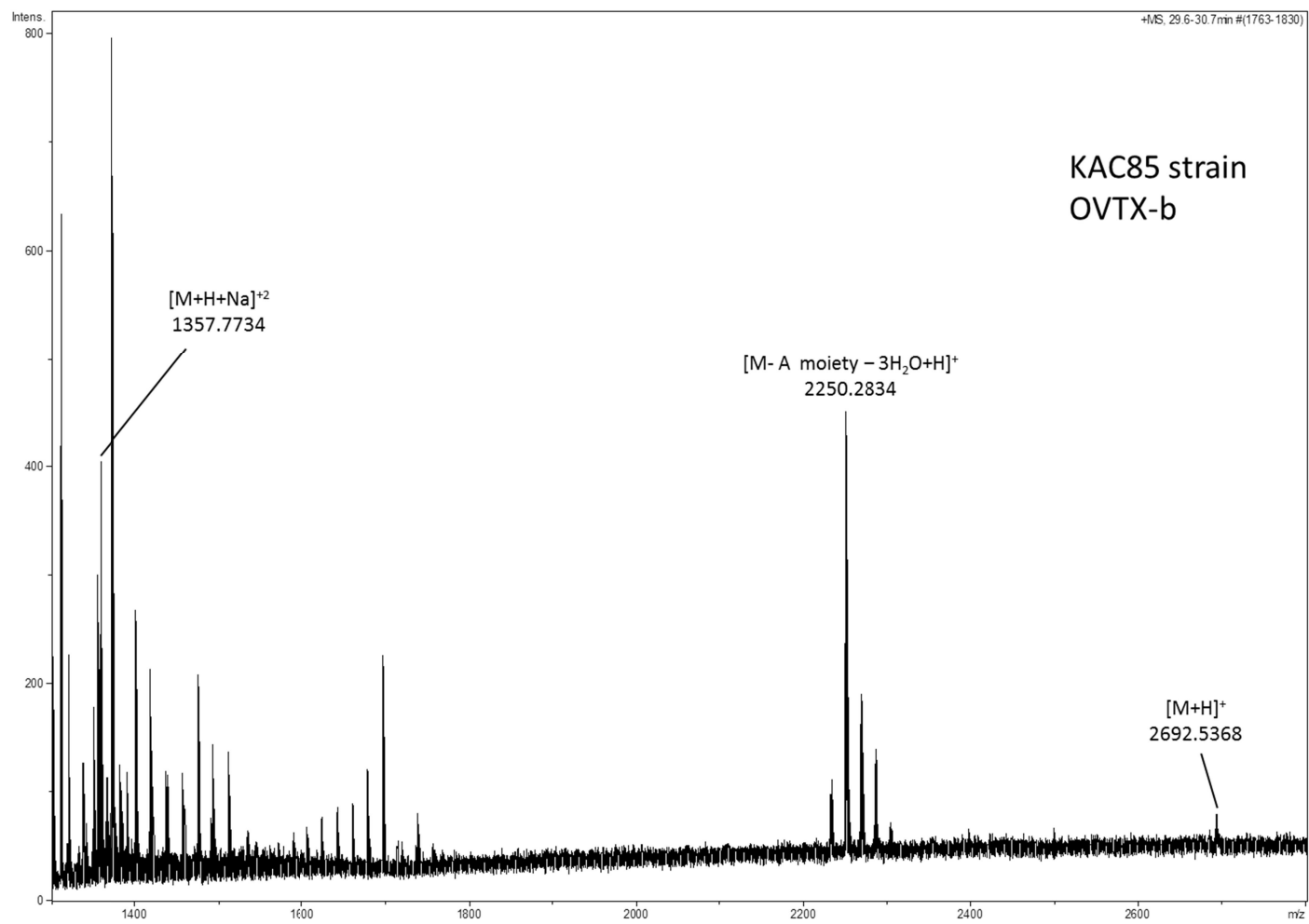


Fig.44 High-resolution MS spectra of OVTX-b from KAC85 strain.

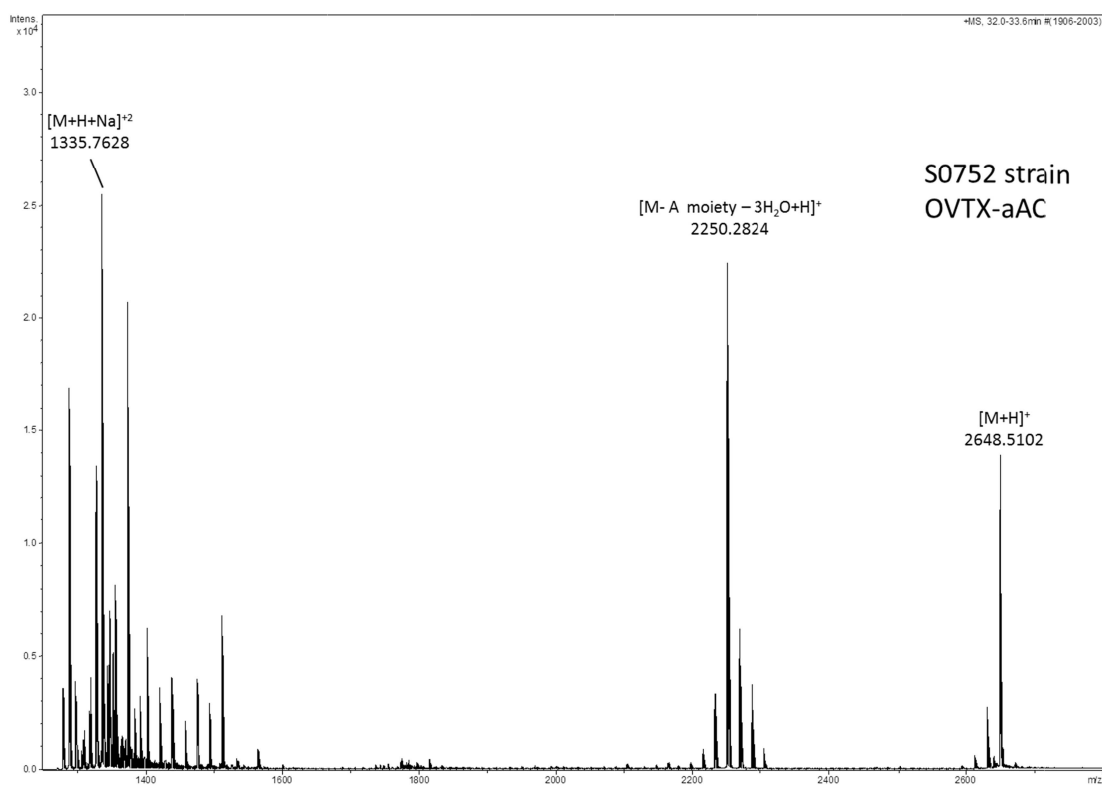
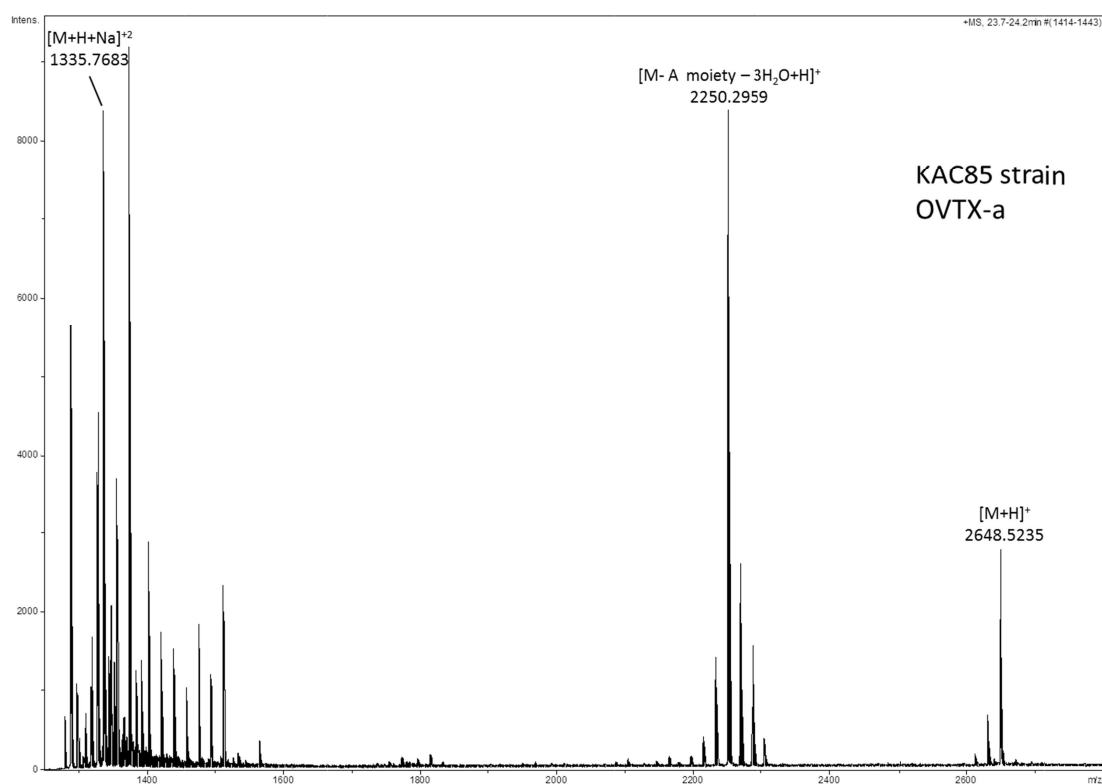


Fig.45 High-resolution MS spectra of OVTX-a and -aAC from KAC85 and S0752 strain.

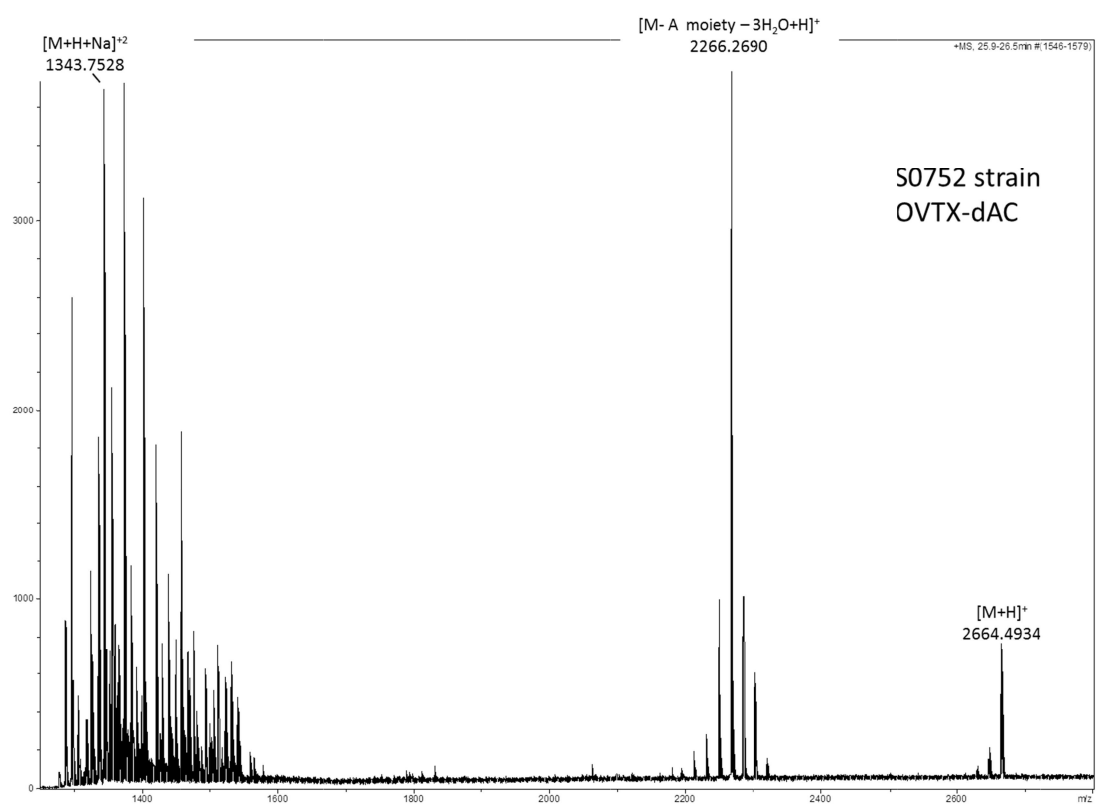
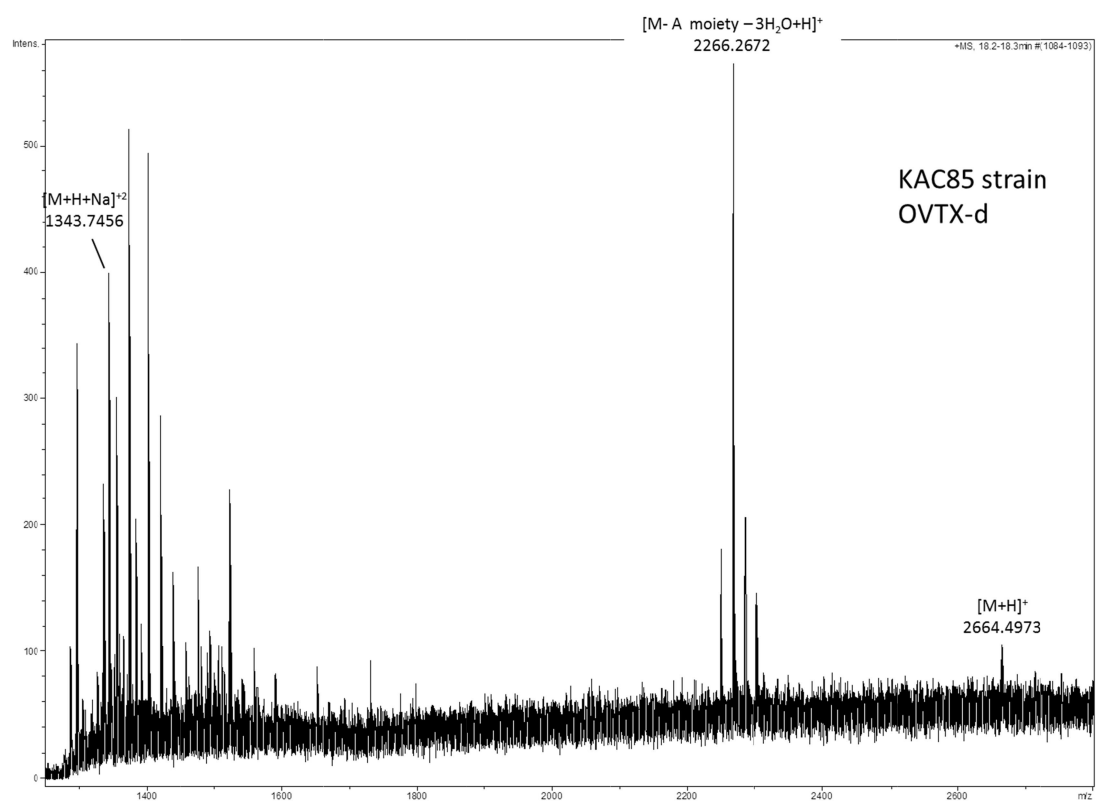


Fig.46 High-resolution MS spectra of OVTX-d and -dAC from KAC85 and S0752 strain.

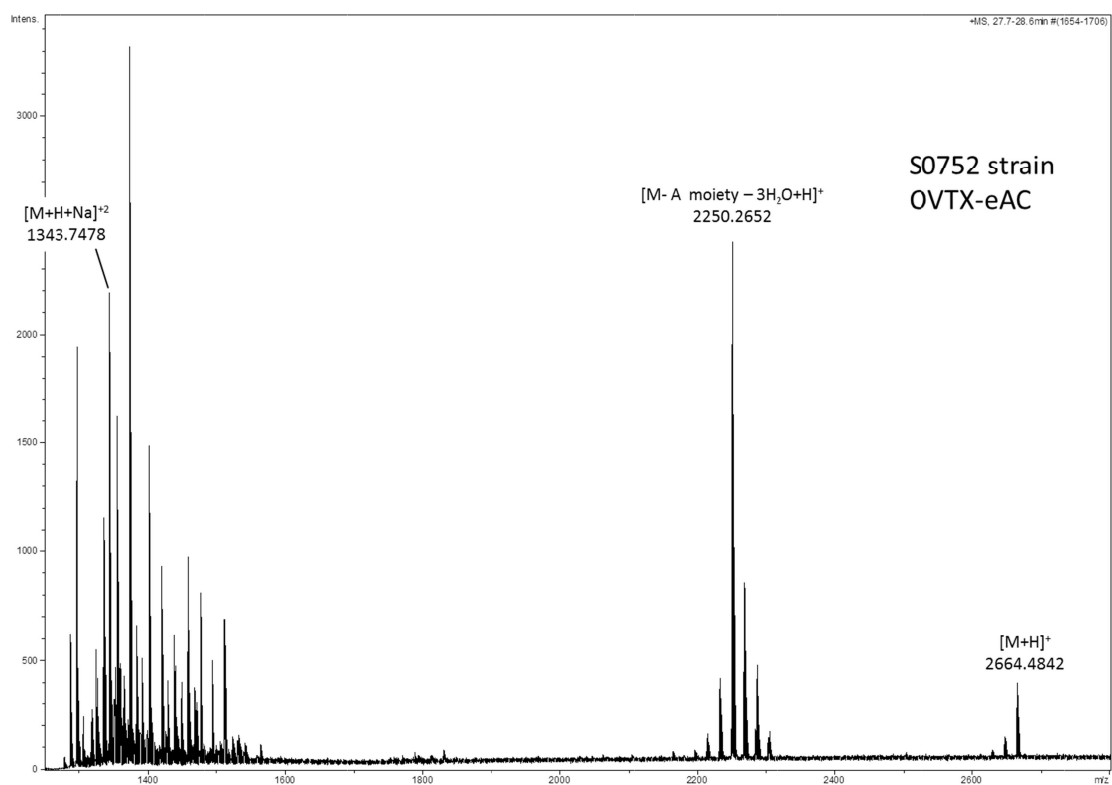
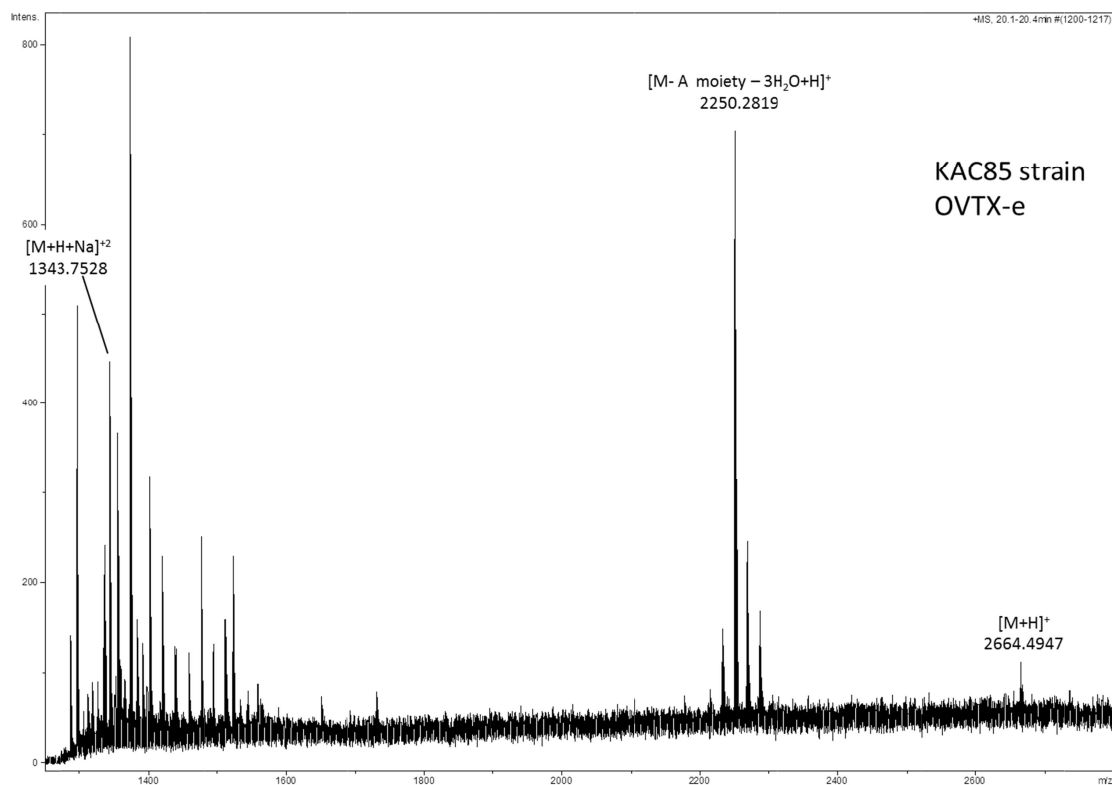


Fig.47 High-resolution MS spectra of OVTX-e and -eAC from KAC85 and S0752 strain.

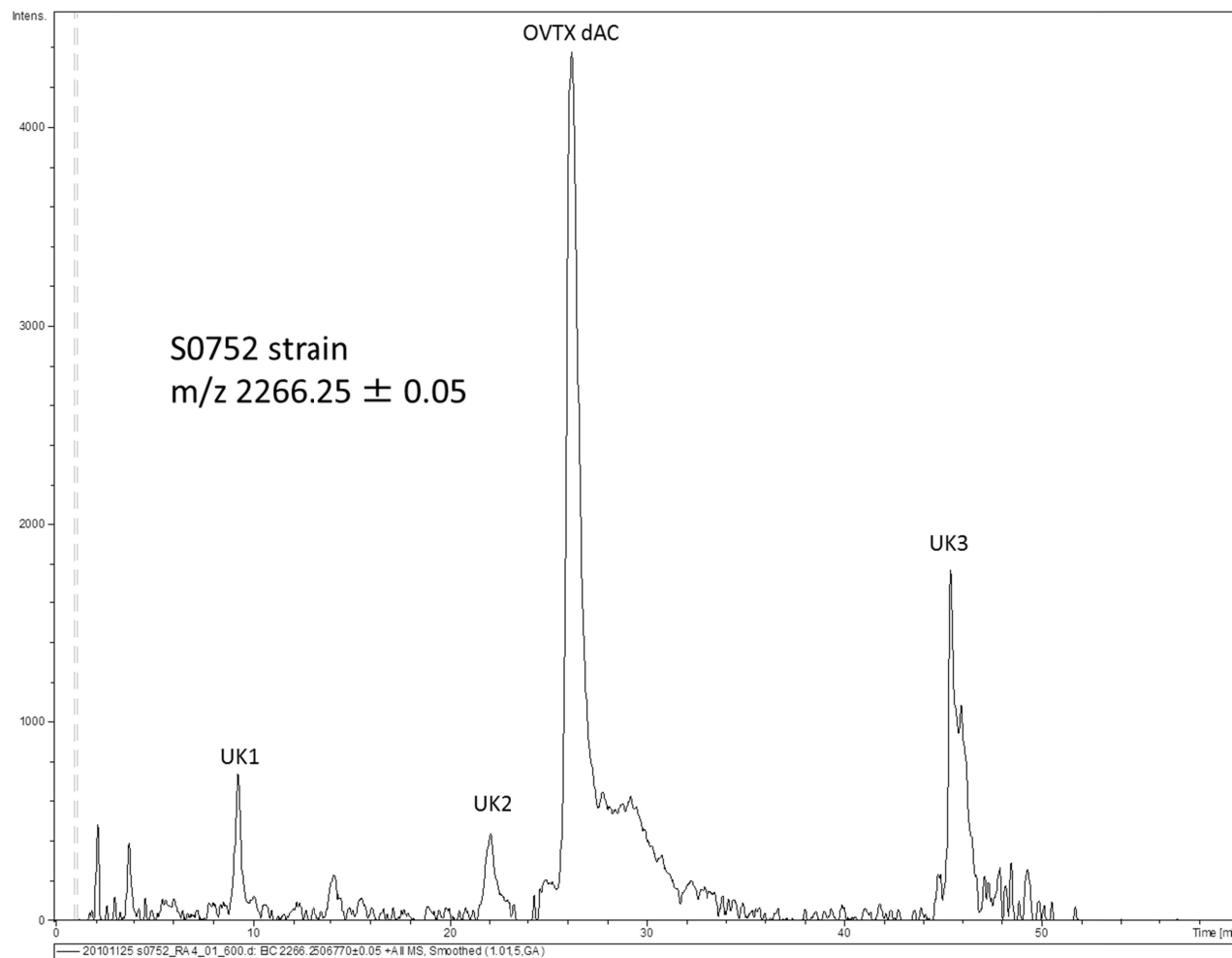


Fig.48 Extracted ion chromatogram of OVTX analogue  $[M- A \text{ moiety} + H]^+$   
 $m/z$  2266 obtained by insource fragmentation. UK = unknown OVTX analogue.

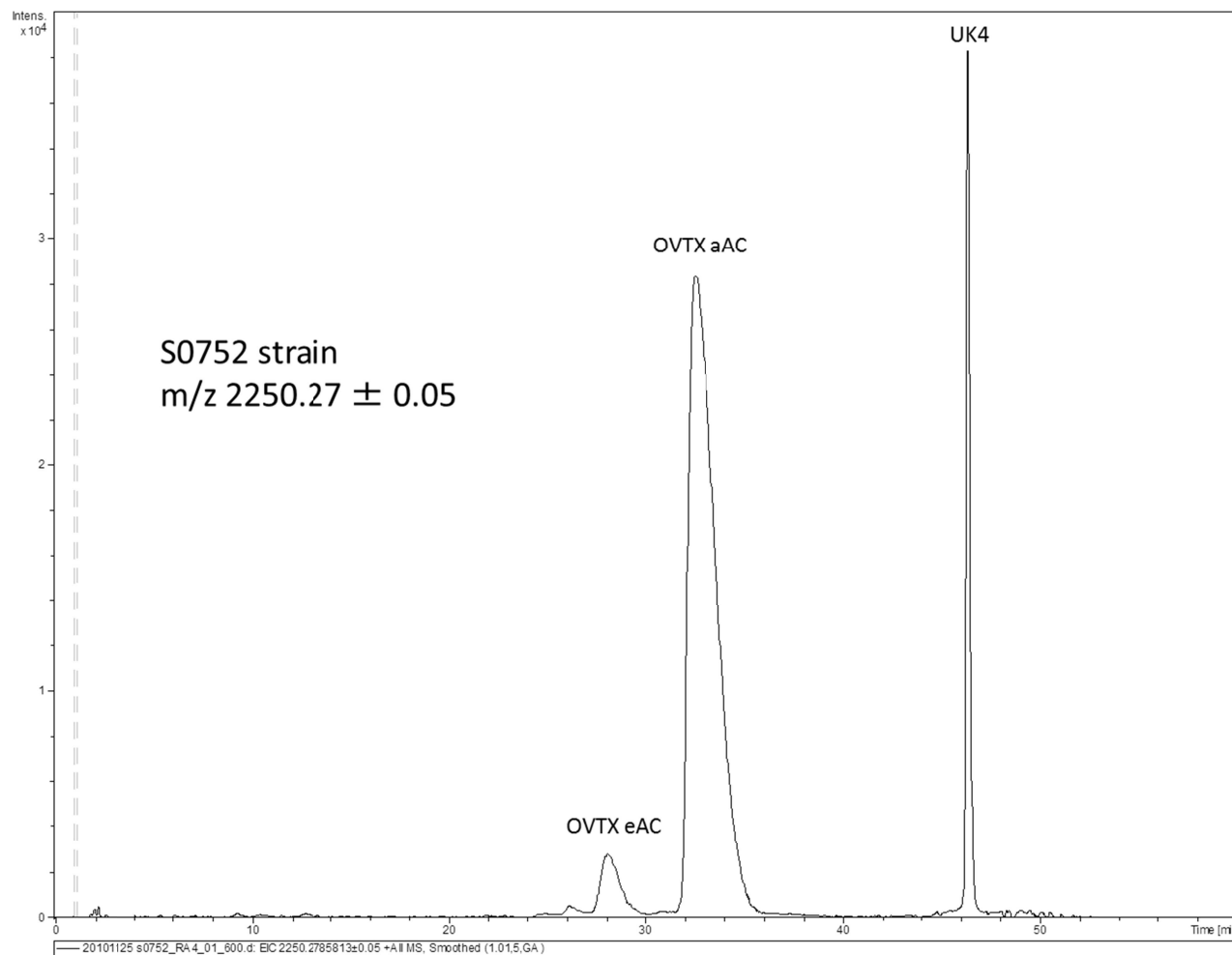


Fig.49 Extracted ion chromatogram of OVTX analogue  $[M - A \text{ moiety} + H]^+$   
 $m/z$  2250 obtained by insource fragmentation. UK=unknown ovatoxin analogue.

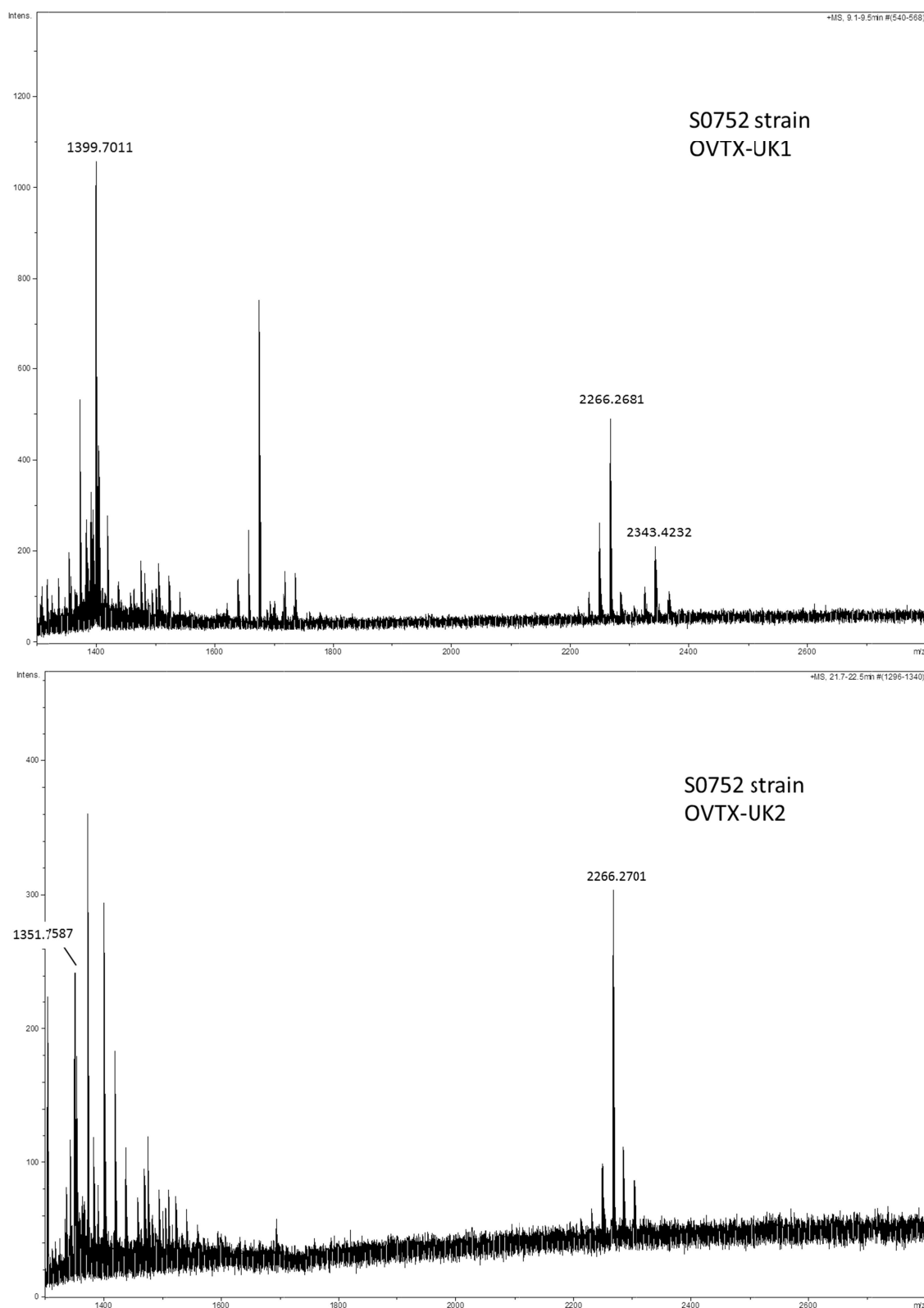


Fig.50 High-resolution MS spectra of unknown OVTX analogue of  $[M+Na+H]^{2+}$  and  $[M-A moiety+H]^+$  ions.



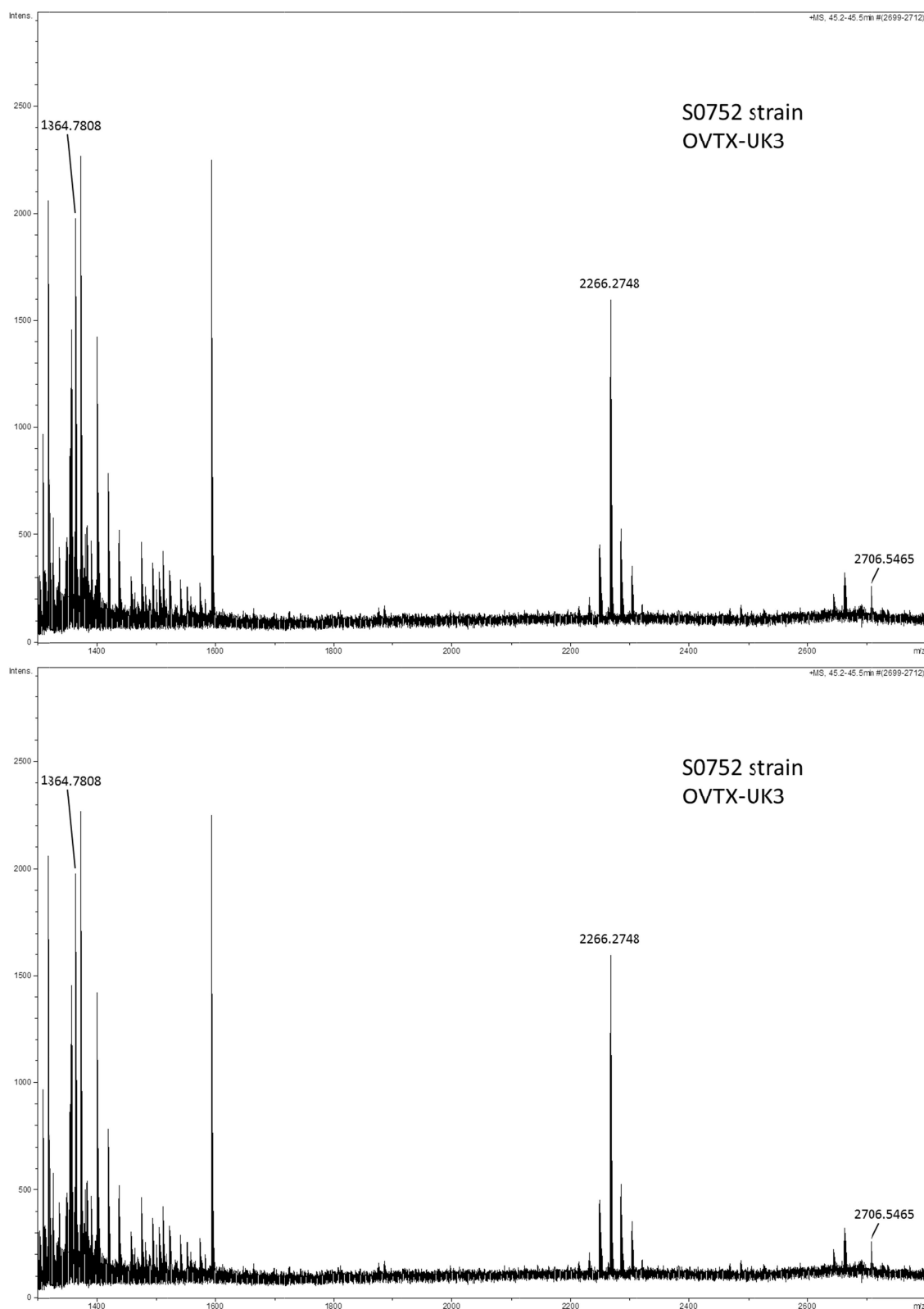


Fig.51 High-resolution MS spectra of unknown OVTX analogue of  $[M+Na+H]^{2+}$ ,  $[M-A moiety+H]^+$ , and  $[M+H]^+$  ions.

Table.12 High-resolution MS data of OVTX analogue obtained from full scan MS spectra.

	mono-isotopic ion			Retention time (min)
	$[M+H+Na]^{2+}$	$[M+H]^+$	$[M-A \text{ moiety}-3H_2O+H]^+$	
OVTX-aAC	1335.2388	2647.5055	2249.2796	32.1
OVTX-dAC	1343.2525	2663.4934	2265.2649	25.9
OVTX-eAC	1343.2455	2663.4822	2249.2609	28.1
OVTX-UK1	1399.2010	-	2265.2627	9.1
OVTX-UK2	1351.2501	-	2265.2723	21.9
OVTX-UK3	1364.2808	2705.5331	2265.2711	45.3
OVTX-UK4	1356.2787	2689.5450	2249.2727	46.2

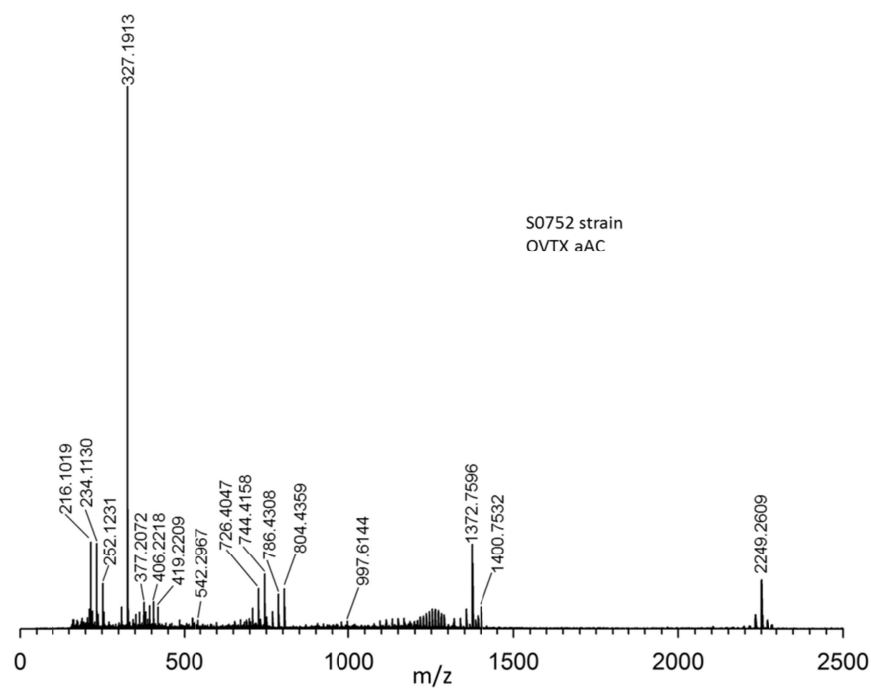
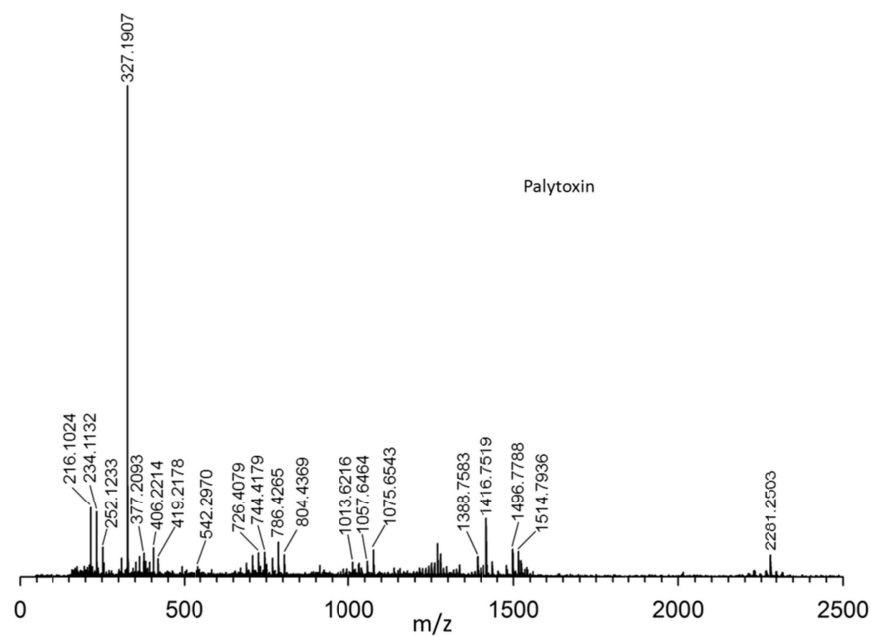


Fig.52 High-resolution LC-MS/MS product ion spectra obtained for  $[M+2H-H_2O]^{2+}$  ions of authentic PLTX and OVTX-aAC

Table.13 High-resolution MS/MS data of the same product ions of authentic PLTX and OVTX-aAC.

PLTX	OVTX a AC	Formula
216.1024	216.1019	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>2</sub>
234.1132	234.1130	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>3</sub>
252.1233	252.1231	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>4</sub>
327.1907	327.1913	C <sub>16</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
377.2084	377.2072	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
406.2214	406.2218	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> NO <sub>6</sub>
419.2178	419.2167	C <sub>22</sub> H <sub>31</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>
542.2970	542.2967	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> NO <sub>10</sub>
726.4079	726.4047	C <sub>37</sub> H <sub>60</sub> NO <sub>13</sub>
744.4179	744.4158	C <sub>37</sub> H <sub>62</sub> NO <sub>14</sub>
786.4265	786.4308	C <sub>39</sub> H <sub>64</sub> NO <sub>15</sub>
804.4369	804.4359	C <sub>39</sub> H <sub>66</sub> NO <sub>16</sub>

Table.14 High-resolution MS/MS data of the different product ions between authentic PLTX and OVTX-aAC.

PLTX	Formula	OVTX a AC	Formula
1013.6194	C <sub>52</sub> H <sub>89</sub> N <sub>2</sub> O <sub>17</sub>	997.6169	C <sub>52</sub> H <sub>89</sub> N <sub>2</sub> O <sub>16</sub>
1388.7583	C <sub>69</sub> H <sub>114</sub> NO <sub>27</sub>	1372.7596	C <sub>69</sub> H <sub>114</sub> NO <sub>26</sub>
1416.7519	C <sub>70</sub> H <sub>114</sub> NO <sub>28</sub>	1400.7532	C <sub>70</sub> H <sub>114</sub> NO <sub>27</sub>
2281.2503	C <sub>113</sub> H <sub>190</sub> NO <sub>45</sub>	2249.2609	C <sub>113</sub> H <sub>190</sub> NO <sub>43</sub>
1075.6543	C <sub>54</sub> H <sub>95</sub> N <sub>2</sub> O <sub>19</sub>		
1514.7936	C <sub>75</sub> H <sub>120</sub> NO <sub>30</sub>		

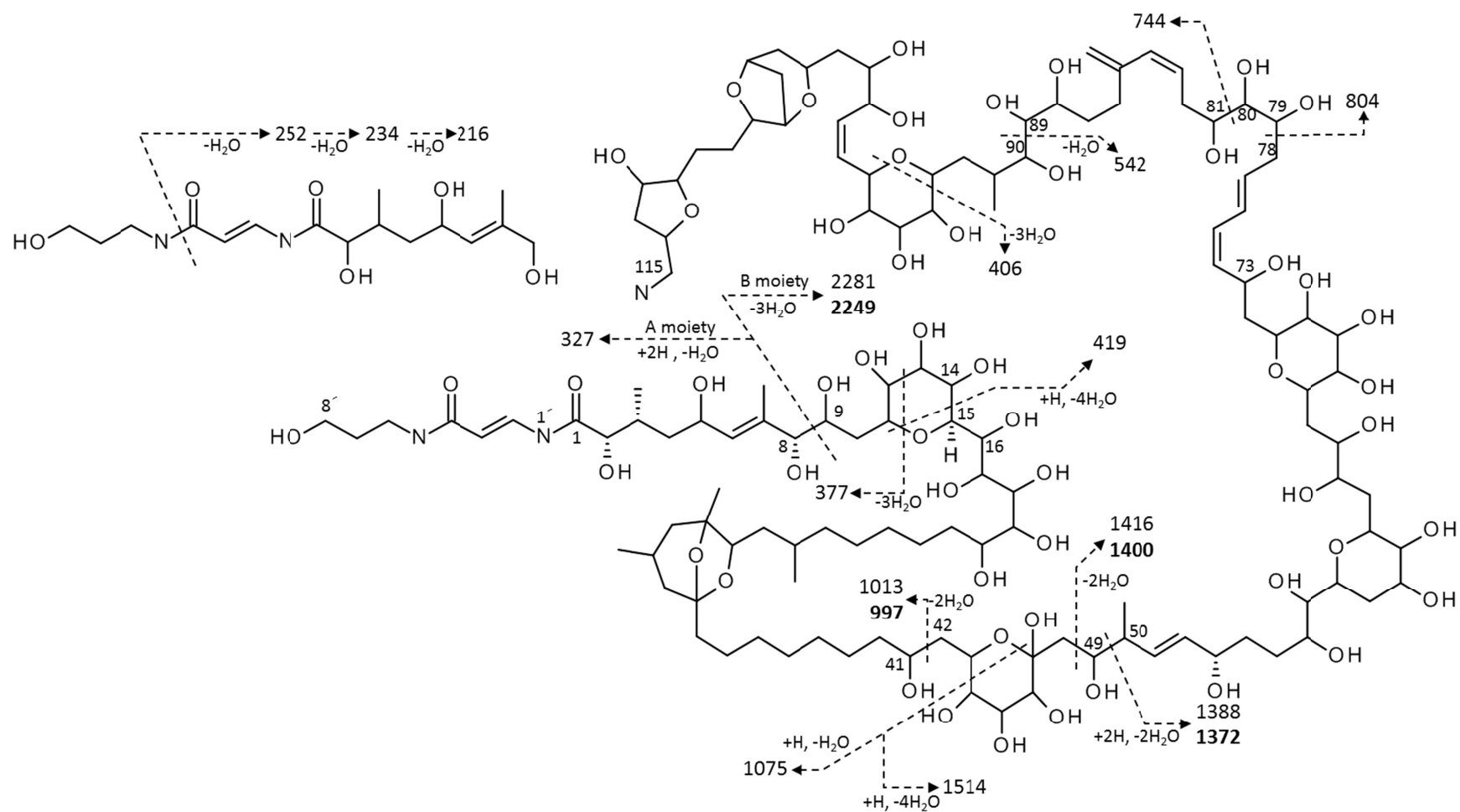


Fig.53 Fragmentation diagram of qTOF MS/MS spectra of authentic PLTX and OVTX-aAC. Bold font is shifting fragmentation ion of OVTX-aAC.

## 総括

有毒微細藻類を原因とする魚介類の毒化は世界中で広く発生し、食品衛生上大きな問題である。わが国においても下痢性・脂溶性貝毒や麻痺性貝毒を生産する原因藻のほか、さまざまな食中毒原因毒を生産する有毒微細藻類の存在が確認されている。機器分析による魚介類の食中毒原因毒の分析は、食品衛生ならびに漁業者への経済的被害の観点からも精確な分析法が求められる。また、機器分析により食の安心・安全を保つためには有毒微細藻類の毒生産能や新規類縁体に関する知見も極めて重要である。これらの背景のもと筆者は LC/MS, MS/MS 分析への移行が決まっている下痢性・脂溶性貝毒について高感度かつ精密な定量方法を確立し、国内で中毒事例のない記憶喪失性貝毒 DA および PLTX 類縁体についても精密分析法を検討することにより、原因藻の毒生産能や新規類縁体を解析した。

下痢性・脂溶性貝毒の定量分析において陰イオンモードの LC/MS 分析ではマトリックスの影響によりイオン化が促進し、前処理カートリッジカラムによる簡易的な前処理によりイオン化促進物質は効率的に除去された。マトリックスの影響は地域や季節変動など様々な要因で変化すると考えられ、今後のデータの蓄積が必要となる。また、オカダ酸群の蛍光 HPLC 分析ではシリカカラムの前処理を省略し、カラムスイッチング法を応用した自動前処理法を開発することにより、LC/MS 分析に匹敵する高感度かつ高精度な分析法を確立した。定量値も LC/MS 分析と高い相関を示し、LC/MS 分析の代替法として有望と考える。

広島県で採集した *Pseudo-nitzschia* 属の DA 生産能として *P. multiseries* に加え、新たに本邦から採集した *P. multistriata* の DA 生産能が確認された。この結果から、DA 生産有毒プランクトンの監視においては、この 2 種の監視が重要と考える。生産量は低いながらも DA による毒化のリスクは少なからず存在することから二枚貝の監視も必要である。*P. multiseries* および本邦で DA の生産が確認されていない *P. pungens* は形態が似ており、光学顕微鏡などによる判別は難しいため、遺伝子や電子顕微鏡によって同定されている。本研究において開発した固相抽出による海水中の DA の濃縮法は、海水中に存在する極めて微量な DA を濃縮し、

検出するための前処理法として有用であり、DA 生産藻の監視に有効である。

国内沿岸で採集した底生渦鞭毛藻 *Ostreopsis* 属が生産する PLTX 類縁体は、イタリア地中海で採集された *Ostreopsis* 属が生産する既知 OVTX 群の異性体であり、LC/QTOFMS 分析の特徴的なフラグメントイオンより新規 PLTX 類縁体について網羅的な検索が可能であった。また LC/MS/MS 分析は微量な試料においても測定することが可能であり、既知化合物の MS/MS スペクトルを体系的にその化学構造に帰属し、新規類縁体についてもその MS/MS スペクトルを解析することにより、有用な構造情報が得られる。さらに MS/MS スペクトルから得られた構造情報は NMR などの構造解析に有益な情報を与える。またイオントラップ型の質量分析装置による高次 MS/MS 測定によって、より詳細なフラグメント解析が可能になると考えられる。

このようにわが国には、様々な有毒微細藻類が生産する毒により魚介類が毒化するリスクが存在する。LC/MS/MS 法や蛍光 HPLC 法などの機器分析は、有毒微細藻類が生産する海洋生物毒の定量分析や毒生産能、新規類縁体の構造解析に非常に有用であり、本研究の成果が機器分析による食の安心・安全の向上に資することに大きく期待する。

## 参考文献

- A.F. Flanagan, K.R. Callanan, J. Donlon, R. Palmer, A. Forde, M. Kane (2001) A cytotoxicity assay for the detection and differentiation of two families of shellfish toxins. *Toxicon*. **39** 1021-1027
- A. Furey, M. Lehané, M. Gillman, P. Fernandez-Puente, K.J. James (2001) Determination of domoic acid in shellfish by liquid chromatography with electrospray ionization and multiple tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **938** 167-174
- Alain Lombet, Jean-Noel Bidard, Michel Lazdunski (1987) Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage-dependent Na<sup>+</sup> channel. *Federation of European Biochemical Societies*. **219** (2) 335-359
- Angel. C. Alcala, Lawton C. Alcala, John S. Garth, Daisuke Yasumura, Takeshi Yasumoto (1988) Human Fatality due to ingestion of the crab *Demania Reynaudii* that contained a palytoxin-like toxin. *Toxicon*. **26** (1) 105-107
- A. Tubaro, S. Sosa, M. Carbonatto, G. Altinier, F. Vita, M. Melato, M. Satake, T. Yasumoto (2003) Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice. *Toxicon*. **41** 783-792
- Aurelie Lelong, Helene Hegaret, Philippe Soudant, Stephen S. Bates (2012) *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: revisiting previous paradigms. *Phycologia*. **51** (2) 168-216
- Beatriz Paz, Antonio H. Daranas, Manuel Norte, Pilar Riobó, José M. Franco, José J. Fernández (2008) Yessotoxins, a Group of Marine Polyether Toxins: an Overview. *Marine Drugs*. **6** 73-102



Bryan Grimmelt, M.S. Nijjar, Jennifer Brown, Neil Macnair, Sandy Wagner, Gerry R. Johnson , James F. Amend (1990) Relationship between domoic acid levels in the blue mussel (*Mytilus Edulis*) and toxicity in mice. *Toxicon*. **28** (5) 501-508

Corinna Bialojan, Akira Takai (1988) Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. *Biochem. J.* **256** 283-290

Christopher Owen Milesa, Alistair L. Wilkins, Allan D. Hawkes, Dwayne J. Jensen, Andrew I. Selwood, Veronica Beuzenberg, A. Lincoln MacKenzie, Janine M. Cooney, Patrick T. Holland (2006) Isolation and identification of pectenotoxins-13 and -14 from *Dinophysis acuta* in New Zealand. *Toxicon*. **48** 152-159

Christopher O. Milesa, Alistair L. Wilkins, Rex Munday, Mark H. Dines, Allan D. Hawkes, Lyn R. Briggs, Morten Sandvik, Dwayne J. Jensen, Janine M. Cooney, Patrick T. Holland, Michael A. Quilliam, A. Lincoln MacKenzie, Veronica Beuzenberg, Neale R. Towers (2004) Isolation of pectenotoxin-2 from *Dinophysis acuta* and its conversion to pectenotoxin-2 seco acid, and preliminary assessment of their acute toxicities. *Toxicon*. **43** 1-9

Christopher O. Miles, Ingunn A. Samdal, John A.G. Aasen, Dwayne J. Jensen, Michael A. Quilliam, Dirk Petersen, Lyn M. Briggs, Alistair L. Wilkins, Frode Rise, Janine M. Cooney, A. Lincoln MacKenzie (2005) Evidence for numerous analogs of yessotoxin in *Protoceratium reticulatum*. *Harmful Algae*. **4** 1075-1091

Donald M. Anderson, Per Andersen, V. Monica Bricelj, John J. Cullen, J. E. Jack Rensel (2001) Monitoring and Management Strategies for Harmful Algal Blooms in Coastal Waters. *Asia Pacific Economic Program, Singapore, and Intergovernmental Oceanographic Commission Technical Series No.59*, Paris.

Edward J. Schantz, James D. Mold, D. Warren Stanger, John Shavel, Frank J. Riel, John P. Bowden, Joseph M. Lynch, Ruth Savage Wyler, Byron Riegel, Hermann Sommer (1957) Paralytic Shellfish Poison. VI. A Procedure for the Isolation and Purification of the Poison from Toxic Clam and Mussel Tissues. *Journal of the American Chemical Society*. **79** 5230-5235

Edward. J. Schantz, V. E. Ghazarossian, H. K. Schnoes, F. M. Strong, J. P. Springer, John O. Pezzanite, Jon Clardy (1974) The structure of saxitoxin. *Journal of the American Chemical Society*. **97** (5) 1238-1239

Ehlers, Scholz J, These , Hessel S, Preiss-Weigert , Lampen (2011) Analysis of the passage of the marine biotoxin okadaic acid through an in vitro human gut barrier. *Toxicology* **279** 196-202

Elie Fux, Juliette L. Smith, Mengmeng Tong, Leonardo Guzmán, Donald M. Anderson (2011) Toxin profiles of five geographical isolates of *Dinophysis* spp. from North and South America. *Toxicon* **57** 275-287

Emiko Ito, Masayuki Satake, Katsuya Ofuji, Nobuyuki Kuritaa, Terry McMahon, Kevin James, Takeshi Yasumoto (2000) Multiple organ damage caused by a new toxin azaspiracid, isolated from mussels produced in Ireland. *Toxicon*. **38** 917-930

Emiko Ito, Masayuki Satake, Katsuya Ofuji, Morihiro Higashi, Kenichi Harigaya, Terry McMahon, Takeshi Yasumoto (2002) Chronic effects in mice caused by oral administration of sublethal doses of azaspiracid, a new marine toxin isolated from mussels. *Toxicon*. **40** 193-203

Emiko Ito, Toshiyuki Suzuki, Yasukatsu Oshima, Takeshi Yasumoto (2008) Studies of diarrhetic activity on pectenotoxin-6 in the mouse and rat. *Toxicon*. **51** 707-716

European Food Safety Authority (2009) Marine biotoxins in shellfish – Saxitoxin group Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA journal*. **1019** 1-76

European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins (2011) EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS. Version.4

Ewen C. D. Todd (1993) Domoic Acid and Amnesic Shellfish Poisoning - A Review. *Journal of Food Protection*. **56** (1) 69-83

Food and Agriculture Organization of the United Nations; FAO (2011) Assessment and management of biotoxin risks in bivalve molluscs. Chapter Yessotoxins. *FAO Fisheries and Aquaculture technical paper* **551** 235-270

Gordon R. Macpherson, Ian W. Burton, Patricia LeBlanc, John A. Walter, Jeffrey L. C. Wright (2003) Studies of the Biosynthesis of DTX-5a and DTX-5b by the Dinoflagellate *Prorocentrum maculosum*: Regiospecificity of the Putative Baeyer Villigerase and Insertion of a Single Amino Acid in a Polyketide Chain. *J. Org. Chem.* **38** 1659-1664

Hideaki Uchida, Yohsuke Taira, Takeshi Yasumoto (2013) Structural elucidation of palytoxin analogs produced by the dinoflagellate *Ostreopsis ovata* IK2 strain by complementary use of positive and negative ion liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **27** 1999-2008

Hirota Fujiki, Masami Suganuma, Hiroko Suguri, Shigeru Yoshizawa, Kanji Takagi, Naoto Uda, Kazumasa Wakamatsu, Kiyoyuki Yamada, Michio Murata, Takeshi Yasumoto, Tadasugu Suganuma (1988) Diarrhetic shellfish toxin, dinophysistoxin-1, is a potent tumor promoter on mouse skin. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* **79** 1089-1093

Hiroyuki Ogino, Masanori Kumagai, Takeshi Yasumoto (1997) Toxicologic evaluation of yessotoxin. *Natural Toxins*. **5** 255-259

貝毒研究の最先端-現状と展望- (2007) 今井一郎, 福代康夫, 広石伸互 編, 恒星社厚生閣

Hitoshi Ishida, Akira Nozawa, Kazuhiro Totoribe, Norio Muramatsu, Haruo Nukaya, Kuniro Tsuji, Kentaro Yamaguchi, Takeshi Yasumoto, Henry Kaspar, Natasha Berkett, Takuo Kosuge (1995) Brevetoxin B1, a new polyether marine toxin from the New Zealand shellfish, *Austrovenus stutchburyi*. *Tetrahedron Letters*. **36** (5) 725-728

J.C. de Fouw, H. P. van Egmond, G. J. A. Speojers (2001) Ciguatera fish poisoning: a review. *RIVM. report* **388802 021** 1-66

Jean-Nod Bidard, Henk P. M. Vijverberg, Christian Frelin, Eliane Chungue, Anne-Marie Legrand, Raymond Bagnis, Michel Lazdunski (1984) Ciguatoxin Is a Novel Type of Na<sup>+</sup> Channel Toxin. *The journal of biological chemistry*. **259** (13) 8353-8357

Jennifer K. Lloyd, Jeffrey S. Duchin, Jerry Borchert, Harold Flores Quintana, Alison Robertson (2013) Diarrhetic Shellfish Poisoning, Washington, USA, 2011. *Emerging Infectious diseases* **19** (8) 1314-1316

J. L. C. Wright, R. K. Boyd, A. S. W. DE Freitas, M. Falk, R. A. Foxall, W. D. Jamieson, M. V. Laycock, A. W. McCulloch, A. G. Mchinnis, P. Odense, V. P. Pathak, M. A. Quilliam, M. A. Ragan, P. G. Sim, P. Thibault, J. A. Walter, M. Gilgan, D. J. A. Richard, D. Dewar (1989) Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. *Can. J. Chem.* **67** 481-190

Jong-Soo Lee, Michio Murata, Takeshi Yasumoto (1988) Analytical method for determination of diarrhetic shellfish toxins. *Mycotoxins and phycotoxins*. 327-334

Jong-Soo Lee, Teruo Igarashi, Santiago Fraga, Einal Dahl, Peter Hovgaard, Takeshi Yasumoto (1989) Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *Journal of Applied Phycology*. **1** (2) 147-152

Jong Soo Lee, Toshihiko Yanagi, Ritsuko Kenma, Takeshi Yasumoto (1987) Fluorometric Determination of Diarrhetic Shellfish Toxins by High-Performance Liquid Chromatography. *Agric. Biol. Chem.* **51** (3) 877-881

Jyoti Tripuraneni, Athanasia Koutsouris, Lidija Pestic, Primal De Lanerolle, Gail Hecht (1997) The Toxin of Diarrhetic Shellfish Poisoning, Okadaic Acid, Increases Intestinal Epithelial Paracellular Permeability. *Gastroenterology*. **112** 100-108

Kazumi Matsuoka, Rika Fujii, Masao Hayashi, Zhaohui Wang (2006) Recent occurrence of toxic *Gymnodinium Graham* (Gymnodinial Deisn,ophyceae) in sediments of West Japan. *Pateontological Research*. **10** (2) 117-125

Kanehisa Hashimoto, Tamao Noguchi (1989) Recent studies on paralytic shellfish poison in Japan. *Pure & Appl. Chem.* **61** (1) 7-18

環乳第三七号 (1981) 下痢性貝毒検査法. 下痢性貝毒の検査について. 1732-1737

Kathi A.Lefebvre, Alison Robertson (2010) Domoic acid and human exposure risks : A review. *Toxicon*. **56** 218-230

Katsuya Ofuji, Masayuki Satake, Terry McMahon, Joe Silke, Kevin J. James, Hideo Naoki, Yasukatsu Oshima, Takeshi Yasumoto (1998) Two Analogs of Azaspiracid Isolated from Mussels, *Mytilus edulis*, Involved in Human Intoxication in Ireland. *Natural Toxins*. **7** 99-102

Kazuya Murata, Masayuki Satake, Hideo Naoki, Heinrich F. Kaspar Takeshi Yasumoto (1998) Isolation and Structure of a New Brevetoxin Analog, Brevetoxin B2, from Greenshell Mussels from New Zealand. *Tetrahedron*. **54** 735-742

Kiyoshi Teruo, Emiko Ito, Toshihiko Yanagi, Takeshi Yasumoto (1986) Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. I. Ultrastructural changes in the small intestine and liver of suckling mice induced by dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-1. *Toxicon*. **24**. 1141-1151

K. Tachibana, P. J. Scheuer, Y. Tsukitani, H. Kikuchi, D. Van Engen, J. Clardy, Y. Gopichand, Francis J. Schmitz (1981) Okadaic acid, a Cytotoxic polyether from two marine sponges of the Genus *Halichondria*. *Journal of the American Chemical Society* **103** 2471-2472

Leigh Lehane, Richard J. Lewis (2000) Ciguatera: recent advances but the risk remains. *International Journal of Food Microbiology*. **61** 91-125

Lesley Rhodes, David White, Mona Syhre, Maggie Atkinson (1996) *Pseudo-nitzschia* species isolated from New Zealand coastal waters; domoic acid production in vitro and links with shellfish toxicity. *Harmful and Toxic Algal Bloom*. T. Yasumoto, Y. Oshima, Y. Fukuyo. Eds. Intergovernmental Oceanographic commission of UNESCO 155-158

Lesley Rhodes, Janet Adamson, Chris Scholin (2000) *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillariophyceae) in New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*. **34** 463-467

Luisa Orsini, Diana Sarno, Gabriele Procaccini, Roberto Poletti, Jens Dahlmann, Marina Montresor (2002) Toxic *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillariophyceae) from the Gulf of Naples: morphology, toxin analysis and phylogenetic relationships with other *Pseudo-nitzschia* species. *Eur. J. Phycol.* **37** 247-257

Masami Suganuma, Masae Tatematsu, Jun Yatsunami, Shigeru Yoshizawa, Sachiko Okabe, Daisuke Uemura, Hirota Fujiki (1992) An alternative theory of tissue specificity by tumor promotion of okadaic acid in glandular stomach of SD rats. *Carcinogenesis* **13** (10) 1841-1845

Masamichi Ishige, Nanao Satoh, Takeshi Yasumoto (1988) Pathological Studies on the Mice Administered with the Causative Agent of Diarrhetic Shellfish Poisoning (Okadaic Acid and Pectenotoxin-2). *道衛研所報* **38** 15-19

Masanori Kumagai, Toshihiko Yanagi, Michio Murata, Takeshi Yasumoto, Marie Kat, Patrick Lassus, Jose A. Rodriguez-Vazquez (1986) Okadaic Acid as the Causative Toxin of Diarrhetic Shellfish Poisoning in Europe. *Agric. Biol. Chem.* **50** (11) 2853-2857

Masatoshi Hori, Yasuhiro Matsuura, Ryo Yoshimoto, Hiroshi Ozaki, Takeshi Yasumoto, Hideaki Karaki. (1999) Actin depolymerizing action by marine toxin, Pectenotoxin-2. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. **114** (1) 225-229

Masayuki Daiguji, Masayuki Satake, Kevin J. James, Alan Bishop, Lincoln MacKenzie, Hideo Naoki, Takeshi Yasumoto (1998) Structures of New Pectenotoxin Analogs, Pectenotoxin-2 Seco Acid and 7-epi-pectenotoxin-2 Seco Acid, Isolated from a Dinoflagellate and Greenshell Mussels. *Chemistry Letters*. **7** 653-654

Masayuki Satake, Michio Murata and Takeshi Yasumoto (1993) The Structure of CTX3C, A Ciguatoxin Congener isolated from cultured *Gambierdiscus toxicus*. *Tetrahedron Letters*. **34** (12) 1975-1978

Masayuki Satake, Lincoln MacKenzie, Takeshi Yasumoto (1997) Identification of Protoceratium reticulatum as the Biogenetic Origin of Yessotoxin. *Natural toxins*. **5** 164-167

Masayuki Satake, Yoshihiko Ishibashi, Anne-Marie Legrand, Takeshi Yasumoto (1997) Isolation and structure of Ciguatoxin-4A, a New Ciguatoxin Precursor, from Cultures of Dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* and Parrotfish *Scarus gibbus*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60** (12) 2103-2105

Masayuki Satake, Masakazu Fukui, Anne-Marie Legrand, Philippe Cruchet, Takeshi Yasumoto (1998) Isolation and Structures of New Ciguatoxin Analogs, 2,3-DihydroxyCTX3C and 51-HydroxyCTX3C, Accumulated in Tropical Reef Fish. *Tetrahedron Letters*. **39** 1197-1198

Masayuki Satake, Katsuya Ofuji, Hideo Naoki, Kevin J. James, Ambrose Furey, Terry McMahon, Joe Silke, Takeshi Yasumoto (1998) Azaspiracid, a New Marine Toxin Having Unique Spiro Ring Assemblies, Isolated from Irish Mussels, *Mytilus edulis*. *J. Am. Chem. Soc.* **120** 9967-9968



Marsha Taylor, Lorraine McIntyre, Mark Ritson, Jason Stone, Roni Bronson, Olga Bitzikos, Wade Rourke, Eleni Galanis (2013) Outbreak of Diarrhetic Shellfish Poisoning Associated with Mussels, British Columbia, Canada. *Marine drugs* **11** 1669-1676

Maria Wiese, Paul M. D'Agostino, Troco K. Mihali, Michelle C. Moffitt, Brett A. Neilan (2010) Neurotoxic Alkaloids: Saxitoxin and Its Analogs. *Marine Drugs*. **8** 2185-2211

Masaya Usami, Masayuki Satake, Shu Ishida, Akio Inoue, Yukiko Kan, Takeshi Yasumoto (1995) Palytoxin Analogs from the Dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *Journal of the American Chemical Society*. **117** 5389-5390

M. Bates, M. Baker, N. Wilson, L. Lane, S. Handford (1993) Epidemiologic overview of the New Zealand shellfish toxicity outbreak. . The Royal Society of New Zealand. *Marine toxins and New Zealand shellfish. Proceedings of a Workshop on Research Issues* 35-40

Melissa A. Friedman, Lora E. Fleming, Mercedes Fernandez, Paul Bienfang, Kathleen Schrank, Robert Dickey, Marie-Yasmine Bottein, Lorraine Backer, Ram Ayyar, Richard Weisman, Sharon Watkins, Ray Granade, Andrew Reich (2008) Ciguatera Fish Poisoning: Treatment, Prevention and Management. *Marine Drugs*. **6** 456-479

Michio Murata, Masaharu Shimatani, Hiroshi Sugitani, Yasukatsu Oshima, Takeshi Yasumoto (1982) Isolation and structural elucidation of the causative toxin of the diarrhetic shellfish poisoning. *Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries*. **48** (4) 549-552

Michio Murata, Masaki Sano, Takashi Iwashita, Hideo Naoki, Takeshi Yasumoto (1986) The Structure of Pectenotoxin-3, a New Constituent of Diarrhetic Shellfish Toxins. *Agric. Biol. Chem.* **50** (10) 2693-2695

Michio Murata, Masanori Kumagai, Jong Soo Lee and Takeshi Yasumoto (1987) Isolation and structure of Yessotoxin, a novel polyether compound implicated in Diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron Letters.* **28** (47) 5869-5872

Michio Murata, Anne M. Legrand, Yoshihiko Ishibashi, Takeshi Yasumoto (1989) Structures of ciguatoxin and Its Congener. *Journal of the American Chemical Society.* **111** 8929-8931

Michio Murata, Anne M. Legrand, Yoshihiko Ishibashi, Masakazu Fukui, Takeshi Yasumoto (1990) Structures and Configurations of Ciguatoxin from the Moray Eel *Gymnothorax javanicus* and Its Likely Precursor from the Dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *Journal of the American Chemical Society.* **112** 4380-4386

Michael A. Quilliam, Mie Xie, William R. Hardstaff (1995) Rapid Extraction and cleanup for Liquid chromatographic determination of domoic acid unsalted seafood. *Jornal of AOAC international.* **78** (2) 543-553

Michael A. Quilliam (2003) The role of chromatography in the hunt for red tide toxins. *Journal of Chromatography A.* **1000** 527-548

Michael J. Twiner, Philipp Hess, Marie-Yasmine Bottein Dechraoui, Terry McMahon, Melissa S. Samons, Masayuki Satake, Takeshi Yasumoto, John S. Ramsdell, Gregory J. Doucette (2005) Cytotoxic and cytoskeletal effects of azaspiracid-1 on mammalian cell lines. *Toxicon.* **45** 891-900

Michael J. Twiner, Nils Rehmann, Philipp Hess, Gregory J. Doucette (2008) Azaspiracid Shellfish Poisoning: A Review on the Chemistry, Ecology, and Toxicology with an Emphasis on Human Health Impacts. *Marine Drugs*. **6** 39-72

Michael. J. Twiner, Philipp Hess, Gregory J. Doucette (2014) Azaspiracids, toxicology, pharmacology, and risk assessment. L.M. Botana e.d. *Seafood and Freshwater Toxins Third Edition*. 823-855

Minoru Isobe, Yukiteru Sugiyama, Takeharu Ito, Ikuko I. Ohtani, Yoshiaki Toya, Yoshiko Nishigohri, Akira Takai (1995) New analysis Method for protein phosphatase type 2A inhibitors using the firefly bioluminescence system. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59** (12) 2235-2238

Mireille Chinain, H. Taiana Darius, Andre´ Ung, Philippe Cruchet, Zhihong Wang, Dominique Ponton, Dominique Laurent, Serge Pauillac (2010) Growth and toxin production in the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus polynesiensis*(Dinophyceae) in culture. *Toxicon*. **56** 739-750

M. N. Mons, H. P. van Egmond, G. J. A. Speijers (1998) Paralytic shellfish poisoning; A review. *National institute of public health and the environment*. Report nr. **388802005**. 1-47

Naomasa Oshiro, Kentaro Yogi, Shuko Asato, Toshiki Sasaki, Koji Tamanaha, Masahiro Hirama, Takeshi Yasumotof, Yasuo Inafuku (2010) Ciguatera incidence and fish toxicity in Okinawa, Japan. *Toxicon*. **56** 656-661

Olga M. Pulido (2008) Domoic Acid Toxicologic Pathology: A Review. *Marine Drugs*. **6** 180-219

Patrizia Ciminiello, Carmela Dell'Aversano, Ernesto Fattorusso, Martino Forino, Luciana Tartaglione, Claudio Grillo, Nunzia Melchiorre (2008) Putative Palytoxin and Its New Analogue, Ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* Collected Along the Ligurian Coasts During the 2006 Toxic Outbreak. *American Society for Mass Spectrometry*. **19** 111-120

Patrizia Ciminiello, Carmela Dell'Aversano, Emma Dello Iacovo, Ernesto Fattorusso, Martino Forino, Laura Grauso, Luciana Tartaglione, Franca Guerrini, Rossella Pistocchi. (2010) Complex palytoxin-like profile of *Ostreopsis ovata* Identification of four new ovatoxins by high-resolution liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **24** 2735-2744

Patrizia Ciminiello, Carmela Dell'Aversano, Emma Dello Iacovo, Ernesto Fattorusso, Martino Forino, Laura Grauso, Luciana Tartaglione (2012) Isolation and Structure Elucidation of Ovatoxin-a, the Major Toxin Produced by *Ostreopsis ovate*. *Journal of the American Chemical Society*. **134** 1869-1875

Paulo Vale, Maria Antonia de M. Sampayo (2002) First confirmation of human diarrhoeic poisonings by okadaic acid esters after ingestion of razor clams (*Solen marginatus*) and green crabs (*Carcinus maenas*) in Aveiro lagoon, Portugal and detection of okadaic acid esters in phytoplankton. *Toxicon* **40** 989-996

R. Henderson, J. M. Ritchie, G. R. Strichartz (1974) Evidence That Tetrodotoxin and Saxitoxin Act at a Metal Cation Binding Site in the Sodium Channels of Nerve Membrane. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **71** (10) 3936-3940

Richard E. Moore, Paul J. Scheuer (1971) Palytoxin: A New Marine Toxin from a Coelenterate. *Science*. **172** 495-498

Richard E. Moore, Giovanni Bartolini (1981) Structure of Palytoxin. *Journal of the American Chemical Society*. **103** 2491-2494

Richard J. Lewis, Jean-Paul Vernoux, Ian M. Brereton (1998) Structure of Caribbean Ciguatoxin Isolated from *Caranx latus*. *Journal of the American Chemical Society*. **120** 5914-5920

Ryoma Kamikawa, Yoshihiko Sako (2008) rRNA sequences reveal the genetic diversity of *Gambierdiscus* spp. distributing in the coastal area of Western-Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi* **74** (5) 911-912

Sarah M. McDonald, Diana (2007) Identifying Pseudo-nitzschia species in natural samples using genus-specific PCR primers and clone libraries. *Harmful Algae* **6** 849-860

Satoshi Nagai, Yukihiro Matsumiya, Seok-jin Oh, Shigeru Itakura (2004) Effect of nutrients and temperature on encystment of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) isolated from Hiroshima Bay, Japan. *Plankton Biol. Ecol.* **51** (2) 103-109

Shinji Nishiwaki, Hirota Fujiki, Masami Suganuma, Hiroko Furuya-Suguri, Rie Matsushima, Yukari Iida, Makoto Ojika, Kiyoyuki Yamada, Daisuke Uemura, Takeshi Yasumoto, Francis J. Schmitz, Takashi Sugimura (1990) Structure-activity relationship within a series of okadaic acid derivatives. *Carcinogenesis* **11** (10) 1837-1841

Shigeto Taniyama (2008) The occurrence of palytoxin-like poisoning and ciguatera in parts of the main land of Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi*. **74** (5) 917-918

Shinya Ito, Katsuo Tsukada (2001) Matrix effect and correction by standard addition in quantitative liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins. *Journal of Chromatography A*. **943** 39-46

Shinya Sato, Tomohiro Nishimura, Keita Uehara, Hiroshi Sakanari, Wittaya Tawong, Naohito Hariganeya, Kirsty Smith, Lesley Rhodes, Takeshi Yasumoto, Yosuke Taira, Shoichiro Suda, Haruo Yamaguchi, Masao Adachi. (2011) Phylogeography of *Ostreopsis* along West Pacific Coast, with Special Reference to a Novel Clade from Japan. *PLoS ONE* **6** (12) 1-14

S. S. Bates, C J. Bird, A. S. W. de Freitas, R. Foxall, M. Gilgan, L. A. Hanic, G. R. Johnson, A. W. McCulloch, P. Odense, R. Pocklington, M. A. Quilliam, P. G. Sim, J. C. Smith, D. V. Subba Rao, E. C. D. Todd, J. A. Walter, J. L. C. Wright (1989) Pennate Diatom *Nitzschia pungens* as the Primary Source of Domoic Acid, a Toxin in Shellfish from Eastern Prince Edward Island, Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **46** 1203-1215

Suzanne C. Butler, Christopher O. Miles, Amna Karim, Michael J. Twiner (2012) Inhibitory effects of pectenotoxins from marine algae on the polymerization of various actin isoforms. *Toxicology in Vitro.* **26** 493-499

T. Aune, R. Sorby, T. Yasumoto, H. Ramstad, T. Landsverk (2002) Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of yessotoxin towards mice. *Toxicon.* **40** 77-82

Takanori Ukena, Masayuki Satake, Masaya Usami, Yasumatsu Oshima, Hideo Naoki, Tsuyoshi Fujita, Yukiko Kan, Takeshi Yasumoto (2001) Structure Elucidation of Ostreocin D, a Palytoxin Analog Isolated from the Dinoflagellate. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61** (11) 2585-2588

Takanori Ukena, Masayuki Satake, Masaya Usami, Yasumatsu Oshima, Tsuyoshi Fujita, Hideo Naoki, Takeshi Yasumoto (2002) Structural confirmation of ostreocin-D by application of negative-ion fast-atom bombardment collision-induced dissociation tandem mass spectrometric methods. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16** 2387-2393

Takeshi Yasumoto, Yasukatsu Oshima, Magoichi Yamaguchi (1978) Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the tohoku district. *Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries*. **44** (11) 1249-1255

Takeshi Yasumoto, Yasukatsu Oshima, Wataru Sugawara, Yasuwo Fukuyo, Hajime Oguri, Teruo Igarashi, Noritaka Fujita (1980) Identification of *Dinophysis fortii* as the Causative Organism of Diarrhetic Shellfish Poisoning. *Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries*. **46** (11) 1405-1411

Takeshi Yasumoto, M. Murata, Y. Oshima, M. Sano, G. Matsumoto and J. Clardy. (1985) Diarrhoeic shellfish toxins. *Tetrahedron*. **41** 1019-1025.

Takeshi Yasumoto, Daisuke Yasumura, Yasushi Ohizumi, Masami Takahashi, Angel C. Alcala, Lawton C. Alcala (1986) Palytoxin in Two Species of Xanthid Crab from the Philippines. *Agric. Biol. Chem.* **50** (1) 163-167

Takeshi Yasumoto, Naoko Seino, Yasutaka Murakami, Michio Murata (1987) Toxins produced by benthic dinofragellates. *Biol. Bull.* **172** 128-131

Takeshi Yasumoto, Michio Murata, Jong-Soo Lee and Koichiro Torigoe (1988) Polyether toxins produced by dinoflagellates. *Mycotoxins and phycotoxins*. 375-382

Takeshi Yasumoto, Michio Murata (1993) Marine Toxins. *Chem. Rev.* **93** 1897-1909

Takeshi Yasumoto (2005) Chemistry, etiology, and food chain dynamics of marine toxins. *Proc. Japan Acad.* **81** Ser.B (2) 43-51

Takeshi Yasumoto (2013) 海産自然毒中毒の最近の傾向. *Mycotoxins* **63** (1) 73-84

Toru Takagi, Kenji Hayashi, Yutaka Itabashi (1984) Toxic effect of free unsaturated fatty acids in the mouse assay of diarrhetic shellfish toxin by intraperitoneal injection. *Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries*. **50** (8) 1413-1418

Tatiana Yu. Orlova, Inna V. Stonik, Nina A. Aizdaicher, Stephen S. Bates, Claude Le'ger, Johanna Fehling (2008) Toxicity, morphology and distribution of *Pseudo-nitzschia calliantha*, *P. multistriata* and *P. multiseriata* (Bacillariophyta) from the northwestern Sea of Japan. *Botanica Marina*. **51** 297-306

Toshiyuki Suzuki, Tadashi Mitsuya, Hisashi Matsubara, Makoto Yamasaki (1998) Determination of pectenotoxin-2 after solid-phase extraction from seawater and from the dinoflagellate *Dinophysis fortii* by liquid chromatography with electrospray mass spectrometry and ultraviolet detection Evidence of oxidation of pectenotoxin-2 to pectenotoxin-6 in scallops. *Journal of Chromatography A*. **815** (1) 155-160

Toshiyuki Suzuki, V. Beuzenberg, L. Mackenzie, M. A. Quilliam (2004) Discovery of okadaic acid esters in the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuta* from New Zealand using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom* **18** 1131-1138

Toshiyuki Suzuki, Taketo Jin, Yuri Shirota, Tadashi Mitsuya, Yutaka Okumura, Takashi Kamiyama (2005) Quantification of lipophilic toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning in Japanese bivalves by liquid chromatography-mass spectrometry and comparison with mouse bioassay. *Fisheries Science*. **71** 1370-1378



Toshiyuki Suzuki, John A. Walter, Patricia LeBlanc, Shawna MacKinnon, Christopher O. Miles, Alistair L. Wilkins, Rex Munday, Veronica Beuzenberg, A. Lincoln MacKenzie, O. Dwayne J. Jensen, Janine M. Cooney, Michael A. Quilliam (2006) Identification of Pectenotoxin-11 as 34S-Hydroxy pectenotoxin-2, a New Pectenotoxin Analogue in the Toxic Dinoflagellate *Dinophysis acuta* from New Zealand. *Chem. Res. Toxicol.* **19**. 310-318

Toshiyuki Suzuki, Akira Miyazono, Katsuhisa Baba, Rieko Sugawara, Takashi Kamiyama (2009) LC–MS/MS analysis of okadaic acid analogues and other lipophilic toxins in single-cell isolates of several *Dinophysis* species collected in Hokkaido, Japan. *Harmful Algae.* **8** 233-238

Toshiyuki Suzuki, Michael A. Quilliam (2011) LC-MS/MS Analysis of Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) Toxins, Okadaic Acid and Dinophysistoxin Analogues, and Other Lipophilic Toxins. *Analytical Science.* **27** 571-584

Toshiyuki Suzuki, Ryuichi Watanabe, Ryoji Matsushima, Kenji Ishihara, Hajime Uchida, Saori Kikutsugi, Tomoko Harada, Hiroshi Nagai, Masao Adachi, Takeshi Yasumoto, Masakazu Murata (2013) LC-MS/MS analysis of palytoxin analogues in blue humphead parrotfish *Scarus ovifrons* causing human poisoning in Japan. *Food Additives & Contaminants: Part A.* **30** (8) 1358-1364

Toshiyuki Suzuki (2014) Lipophilic Toxins, Pectenotoxins, and Yessotoxins: Chemistry, Metabolism, and Detection. In: Botana LM (ed.). *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection, 3rd edition.* 627-650

Trish M. Perl, Lucie Bedard, Tom Kosatsky, James C. Hockin, Ewen C.D. Todd, Robert S. Remis (1990) An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. *The New England Journal of Medicine.* **322** (25) 1775-1780

Tsunematsu Takemoto, Koji Daigo, Yoshikazu Kondo, Kazue Kondo (1966) Studies on the Constituents of *chondria armata*. *Yakugaku zasshi*. **86** (10) 874-877

Urban Tillmann, Malte Elbrachter, Bernd Krock, Uwe Jhon, Allan Cembella (2009) *Azadinium spinosum* gen. et sp. nov. (Dinophyceae) identified as a primary producer of azaspiracid toxins. *Eur. J. Phycol.* **44** (1) 63-79

V. Hossen, N. Jourdan-da silva, Y. Guillois-Becel, J. marchal, S. Krys (2011) Food poisoning outbreaks linked to mussels contaminated with okadaic acid and ester dinophysistoxin-3 in France, June 2009. *Surveillance and outbreak reports* **16** (11) 1-7

William A. Catterall, Sandrine Cestele, Vladimir Yarov-Yarovoy, Frank H. Yu, Keiichi Konoki, Todd Scheuer (2007) Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*. **49** 124-141

Yasutaka Murakami, Yasukatsu Oshima, Takeshi Yasumoto (1982) Identification of Okadaic Acid As a Toxic Component of a Marine Dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries*. **48** (1) 69-72

Yong-Yeng Lin, Martin Risk, Sammy M. Ray, Donna Van Engen, Jon Clardy, Jerzy Golik, John C. James, Koji Nakanishi (1981) Isolation and Structure of Brevetoxin B from the “Red Tide” Dinoflagellate *Ptychodiscus brevis* (*Gymnodinium breve*) *Journal of the American Chemical Society*. **103** 6773-6775

Yuichi Kotaki, Kazuhiko Koike, Shigeru Sato, Takehiko Ogata, Yasuwo Fukuyo, Masaaki Kodama (1999) Confirmation of domoic acid production of *Pseudo-nitzschia multiseries* isolated from Ofunato Bay, Japan. *Toxicon* **37** 677-682

Yuichi Kotaki, Kazuo Koike, Makoto Yoshida, Chu Van Thuoc, Nguyen Thi Minh Huyen, Nguyen Chu Hoi, Yasuwo Fukuyo, Masaki Kodama (2000) Domoic acid production in *Nitzaschia* sp. (Bacillariophyceae) Isolated from a shrimp culture pond in Do Son, Vietnam. *J. phycol.* **36** 1057-1060

Yuichi Kotaki (2008) Pharmacology, Physiology, and Detection Ecobiology of Amnesic Shellfish Toxin Producing Diatoms. In: Botana LM (ed.). *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection*, 2nd edition. 383-396

Yuji Nagashima, Tamao Noguchi, Junichi Maruyama, Shunichi Kamimura, Kanehisa Hashimoto (1984) Occurrence of Paralytic Shellfish Poisons in an Ascidian *Holocynthia roretzi*. *Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries.* **50** (2) 331-334

Yutaka Onuma, Masayuki Satake, Takanori Ukena, Jean Roux, Suzanne Chanteau, Noelson Rasolofonirina, Mamy Ratsimaloto, Hideo Naoki, Takeshi Yasumoto (1999) Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. *Toxicon.* **37** 55-65

Yuzuru Shimizu, Hong-Nong Chou, Hideo Bando (1986) Structure of Brevetoxin A (GB-1 Toxin), the Most Potent Toxin in the Florida Red Tide Organism *Gymnodinium breve* (*Ptychodiscus brevis*) *Journal of the American Chemical Society.* **108** 514-515

Yuzuru Shimizu, Sandeep Gupta, Kazuo Masuda, Lucie Maranda, Claudia K. Walker, Ronghua Wang (1989) Dinoflagellate and other microalgal toxins : chemistry and biochemistry. *Pure and Appl. Chem.* **61** (3) 513-516

Zhihong Wang, Kristen L. King, John S. Ramsdell, Gregory J. Doucette. (2007) Determination of domoic acid in seawater and phytoplankton by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* **1163** 169-146

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました東京海洋大学海洋科学部海洋環境学科 永井宏史教授ならびに水産総合研究センター中央水産研究所水産物応用開発研究センター 鈴木敏之グループ長に衷心より感謝の意を表します。

本論文校閲を賜りました同学科 遠藤英明教授、神尾道也助教に心より御礼申し上げます。また、サンプリングおよび藻類培養・種同定にご協力いただいた高知大学 足立真佐雄教授、水産総合研究センター 長井敏氏に深く感謝致します。

最後に、本研究を行うにあたり多大なる御理解と御支援を頂きました水産総合研究センター松嶋良次氏、渡邊龍一氏をはじめとする水産総合研究センター中央水産研究所水産物応用開発研究センター衛生管理グループの皆様ならびに家族に感謝致します。